

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Identificación de las proteínas fosfatasa responsables de la  
inactivación de las MAP quinasas en neuronas granulares de  
cerebelo: papel de los receptores P2X7 y Trks**

**Identification of protein phosphatases responsible for MAP  
kinase inactivation in cerebellar granule neurons : role of  
P2X7 and triks receptor**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**María José Queipo García**

**Directoras**

**María Teresa Miras Portugal  
Raquel Pérez Sen  
Esmerilda García Delicado**

**Madrid**

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Veterinaria  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

**Identificación de las proteínas fosfatasas responsables  
de la inactivación de las MAP quinasas en neuronas  
granulares de cerebelo. Papel de los receptores P2X7 y  
Trks**

Identification of protein phosphatases responsible for MAP Kinase inactivation  
in cerebellar granule neurons. Role of P2X7 and Trks receptors.

Tesis Doctoral  
María José Queipo García

Directoras de Tesis  
María Teresa Miras Portugal  
Raquel Pérez Sen  
Esmerilda García Delicado





UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. María José Queipo García,  
estudiante en el Programa de Doctorado de Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina,  
de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

Identificación de las proteínas fosfatasas responsables de la inactivación de las MAP quinasas  
en neuronas granulares de cerebelo. Papel de los receptores P2X7 y Trks.

y dirigida por: María Teresa Miras Portugal, Raquel Pérez Sen, Esmerilda García Delicado.

### DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 28 de agosto de 2019

QUEIPO  
GARCIA, MARIA  
JOSE  
(AUTENTICACIÓN)

Fdo.: N)

Firmado digitalmente  
por QUEIPO GARCIA,  
MARIA JOSE  
(AUTENTICACIÓN)  
Fecha: 2019.08.29  
10:57:50 +02'00'

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.





La presente Tesis Doctoral se ha realizado gracias a una beca predoctoral de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Formación Profesional. Asimismo, ha sido financiada por el Proyecto de Investigación BFU 2014-53654-P del Ministerio de Economía y Competitividad, la “Red de Excelencia Consolidar-Ingenio Spanish IonChannel Initiative” (BFU2015-70067REDC); por la Comunidad de Madrid (BRADE-CM S2013/ICE-2958), y por la Fundación Ramón Areces (PR2018/16-02).



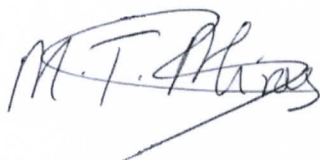
Las Dras. Dña. María Teresa Miras Portugal, Dña. Raquel Pérez Sen y Dña. Esmerilda García Delicado, profesoras del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

**CERTIFICAN:**

Que Dña. María José Queipo García, Licenciada en Farmacia, por la Universidad Alfonso X el Sabio, Licenciada en Bioquímica y Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación que lleva por título: "Identificación de las proteínas fosfatasas responsables de la inactivación de las MAP quinasas en neuronas granulares de cerebelo. Papel de los receptores P2X7 y Trks" como Tesis Doctoral cumpliendo las condiciones exigidas para optar al grado de Doctora con Mención Internacional por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Julio de 2019

Vº Bº de las DIRECTORAS  
Dra. María Teresa Miras Portugal



Dra. Raquel Pérez Sen



Dra. Esmerilda García Delicado







**“Sólo el que sabe es libre, y más libre el que más sabe... Sólo la cultura da libertad... No proclaméis la libertad de volar, sino dad alas; no la de pensar, sino dad pensamiento. La libertad que hay que dar al pueblo es la cultura.”**  
**Miguel de Unamuno**



## Agradecimientos

En primer lugar, quiero darle las gracias a la Dra. María Teresa Miras Portugal, por brindarme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en su laboratorio, pero sobre todo por ser un ejemplo de mujer emprendedora en Ciencia.

Muchísimas gracias a la Dra. Raquel Pérez Sen y a la Dra. Esmerilda García Delicado, por dirigir esta tesis con tanto cariño y tanta dedicación. Por vuestro apoyo y comprensión, por haber sido una verdaderas “*mamis*” científicas, por ayudar a que esto ahora tenga forma, sea real, pese a todo el esfuerzo y disgustos. Gracias por iniciarme en la ciencia y por todo lo que me habéis enseñado. Al Dr. Felipe Ortega, por todas las ideas frescas que has traído, por estar siempre dispuesto a echar una mano en lo que haga falta, pero también por tus chistes malos y por tu vasto conocimiento sobre cine de dudosa calidad. A la Dra. Rosa Gómez, por su amabilidad y su espíritu crítico. Al Dr. Ignacio Díaz, por sus amplios conocimientos en informática y por las conversaciones farmacéuticas sobre homeopatía y pseudociencias varias. A Javi, por amenizarnos las comidas con las anécdotas de los alumnos y por salvarnos en los simulacros de incendio y por ayudarme con mis problemas con el Word. A Lola, por su cariño y por la revisión de esta tesis. A Miguel, muchas gracias por ayudarme tanto con todos los trámites del Doctorado y hacerlo siempre con una sonrisa.

To Dr. Jeanneteau, for allowing me to do my doctoral stay in your lab, for showing so much interest in my research and helping me to understand the development of neurons. To my colleagues in the laboratory in Montpellier: Emi, Yann and Damien, for their kindness, and especially to Nora, for providing me mice and guiding me through the IGF and Montpellier, you are an amazing person. To Kix, for her incredible culinary skills, you are a great cooker. Thanks to Nora and Kix for being my friends, I miss you much. Y a las otras españolas del IGF: Isabel, Laura y Laia, por ser mi salvavidas cuando necesitaba desahogarme en español, espero volver a veros pronto.

A mis compañeros... ¡¿Pero qué digo?! A mis amigos, Juan Carlos y Lucía. Cuando entrásteis en el laboratorio erais como unos hermanos pequeños incordiantes, hasta os tenía tirria. ¡No sé muy bien qué habéis hecho que ahora hasta os quiero! (Pero solo un poco). ¡Tengo tanto que agradeceros! El ayudarnos con los geles cuando estábamos a tope de Western Blot, los cultivos compartidos (TODOS), los viajes al animalario, meternos los 3 juntos a estimular en cultivos cuando no cabíamos y “cagarnos” en todo. Por los “ya veráis...” y los “calmenémonos” y las proteínas del flagelo, por las chaquetas que huelen a “makawe”, por las cajas de cartón gigantes, por ser amigos, cómplices y artífices también de toda esta locura, MIL GRACIAS. Más en particular, he de agradecerle a Juan Carlos su disposición para enseñarme su P2X7 siempre que lo he necesitado, sin ningún tipo de pudor y con toda la naturalidad del mundo, porque por todos es sabido que el suyo es más bonito que el mío. A Lucía, por constatarle a diario que el español es una lengua en continua evolución, que es un hacha jugando al tabú y al furor, y que se pasa el refranero español por el Arco del Triunfo, si no “para muestra un dedal”.

A mi “hija” Lorenita. ¡Porque me has dado tan buenos momentos siendo mi pequeña aprendiz de bruja! Gracias por enseñarme a reírme de las cosas malas, por las incursiones a Primor (o Zara, o a donde fuese) para animarnos cuando no nos salían los Western, por embriarnos, por convertirte en Stephen Hawking al subirme a mi coche, porque cuando llegaste dejé de ser la única a la que se le enganchaban las mangas en los pomos de las puertas. Y, claro está, ¡Porque nadie recibe a los bomberos en ninguna parte del mundo con tanta alegría como tú!.

A Carlos, por ser una persona tan valiente y emprendedora. Gracias por todas esas conversaciones sobre ciencia y por ser una de las personas de las que mejor recuerdo me llevo de los inicios de esta Tesis. Te deseo todo lo mejor, de corazón.

To Caterina and Carolina, for understanding my english even when I didn't understood myself. A María, la última incorporación al laboratorio, por tu rápida adaptación y por estar siempre dispuesta a resolver cualquiera de nuestras dudas, muchas gracias. A Nuria, por su inestimable ayuda al irme abriendo camino entre la tortuosa burocracia del depósito y presentación de la Tesis, por tener siempre una sonrisa y una actitud positiva ante todo. A Alberto, por haber compartido y disfrutado tantos Congresos y GENNes. Al otro Alberto, por amenizarnos las comidas con tu humor tan agudo. A Ricardo, por todas tus recomendaciones sobre Montpellier y tu sentido del humor. A Pepe y Magdalena, por su amabilidad. A Carmen, por su eficiencia y por ser siempre tan agradable. A MariCarmen, por habernos ayudado y enseñado tanto aquí arriba, se te echa de menos.

A todos los que ya no están en el laboratorio: David, Bea, Jose, Jorge, Andrea, Laura, Álvaro, Aida... Sólo puedo desearos lo mejor en vuestros nuevos proyectos.

A mi madre y a mi abuela, porque han estado presentes en mi recuerdo todos y cada uno de los días de esta tesis y de mi vida, porque han sido inspiración para enfrentarme a todas las adversidades, porque han sido el mejor ejemplo de esfuerzo y superación que he podido tener en la vida. Estéis dónde estéis, mil gracias por haberme traído hasta aquí y por haberme enseñado a ser quien soy. Porque fuisteis vosotras quienes me disteis alas y me enseñasteis a volar.

A mi padre, por tanto apoyo, porque sin él nada de esto sería posible. Por confiar en mí cuando ni yo era capaz de hacerlo. Por haberme aguantado mis conversaciones interminables sobre ciencia, pese a no enterarse de nada. Por estar ahí siempre. Por hacer que, desde el primer día que vine a Madrid, me plantease toda mi vida académica como un gran reto al que debía enfrentarme con esfuerzo y valentía, y dar lo mejor de mí misma siempre, porque “todo” nunca es suficiente. Te quiero mucho.

A Tati y a Viti, por preocuparse siempre por mí, por los tupperts y las empanadas, y el jamón... Por vuestro cariño incondicional, por quererme y cuidarme tanto, aún con mi mal humor. No podría desear unos tíos mejores.

A toda mi familia, por tanto cariño y apoyo.

Al amor de mi vida. ¡¿Qué te voy a decir que no sepas?!. No querría vivir una vida sin haberte conocido. Gracias por ser mi apoyo, por enseñarme a relativizar los problemas, a saber que cualquier dificultad es menos importante si tú estás a mi lado. Por ser mi bastón para caminar, mi hombro preferido para llorar y, por supuesto, mi mejor compañero de risas. Porque me has visto reír y llorar a la vez (y sin explotar). Porque conocernos fue providencial. Y, por supuesto, gracias a José Ramón y a “la madre que te parió”, la “Pepis”, que la quiero con locura y que es la mejor asesora de imagen del “mundo mundial”.

## ABREVIATURAS

<b>2MeSADP</b>	2-Metil-tio-Adenosina-5'-Difosfato
<b>5'-NT</b>	5'-Nucleotidasa
<b>ABC</b>	<i>ATP-Binding Cassette</i>
<b>ADF</b>	Factor despolimerizador de actina
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADP</b>	Adenosina 5'-Difosfato
<b>Akt</b>	Proteína Quinasa B
<b>AMP</b>	Adenosina 5'-Monofosfato
<b>AMPA</b>	Ácido- $\alpha$ -Amino-3-hidroxi-5-Metilisosazol-4-Propiónico
<b>AMPc</b>	Adenosina-5'-Monofosfato cíclico
<b>AraC</b>	Citosina- $\beta$ -D-Arabinofuranósido
<b>AP-1</b>	<i>Proteína activadora 1</i>
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>ASK1/2</b>	Quinasa reguladora de la Señal de Apoptosis 1
<b>ATF</b>	Factor Activador de la Transcripción
<b>ATP</b>	Adenosina 5'-Trifosfato
<b>Bax</b>	Proteína X asociada a Bcl2
<b>BBG</b>	Azul Brillant G ( <i>Brilliant Blue G</i> )
<b>BCI</b>	<i>E-2-Benziliden-3-(Ciclohexilamino)-2,3-dihidro-1H-Inden-1-ona</i>
<b>Bcl2</b>	Linfoma de células B 2
<b>BDNF</b>	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
<b>BSA</b>	Albúmina de Suero Bovino
<b>BzATP</b>	3'-O-(4-Benzoil) benzoil Adenosine-5'-Trifosfato
<b>CaMKII</b>	Calcio Calmodulina Quinasa II
<b>CD120a</b>	<i>Cluster of Differentiation 120a</i>
<b>CD73</b>	5'-Nucleotidasa
<b>Cdc42</b>	Proteína de control de la división celular 42
<b>CDK</b>	Quinasa Dependiente de Ciclinas
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2
<b>cPLA2</b>	Fosfolipasa A 2
<b>CREB</b>	Elemento de Unión de Respuesta a AMPc
<b>CTP</b>	Citidina Trifosfato
<b>Cy3/5</b>	Cianina tipo 3/5
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-Fenilindol
<b>DAPK</b>	Proteína Quinasa Asociada a Muerte ( <i>Death Associated Protein Kinase</i> )
<b>DIV</b>	Días <i>in vitro</i>
<b>DLK</b>	Quinasa de la Cremallera Doble de Leucina ( <i>Dual Leucine Zipper Kinase</i> )
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DUSP</b>	Proteína Fosfatasa de Especificidad Dual
<b>EBSS</b>	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo



<b>EDTA</b>	Ácido Etiléndiaminotetraacético
<b>EGF</b>	Factor de Crecimiento Epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor de EGF
<b>EGTA</b>	Ácido Etilenglicol-bis(2-Aminoetiléter)-N,N,N'N'-Tetraacético
<b>Elk-1</b>	<i>ETS Like-1 Protein</i>
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señalización extracelular
<b>EyA</b>	Ojos ausentes ( <i>Eyes Absent</i> )
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FITC</b>	Fluoresceína
<b>GABA</b>	Ácido-g-aminobutírico
<b>GADD</b>	Detención del crecimiento y daño en el ADN
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GDP</b>	Guanosina 5'-Difosfato
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GPCR</b>	Receptores Acoplados a Proteínas G
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>Grb2</b>	Proteína de unión a Receptores de Factores de Crecimiento 2
<b>GSK3</b>	Glucógeno Sintasa Quinasa 3
<b>GTP</b>	Guanosina 5'-trifosfato
<b>HAD</b>	Holoácido Deshalogenasa
<b>HRP</b>	Peroxidasa de Rábano Picante
<b>HSF-1</b>	Factor de Choque Térmico 1 ( <i>Heat Shock Factor 1</i> )
<b>HuR</b>	Antígeno humano R ( <i>Human antigen R</i> )
<b>IC50</b>	Concentración de inhibidor que produce el 50% del efecto máximo
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>JNK</b>	Quinasa de c-Jun en N-terminal
<b>KIM</b>	Dominio de Interacción de Quinasas
<b>LB</b>	<i>Luria Bertani Broth</i>
<b>LMWPTP</b>	PTP de Bajo Peso Molecular ( <i>Low-Molecular-Mass-PTP</i> )
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido bacteriano
<b>L-β,γ-meATP</b>	L-β,γ -metilen-Adenosina-5'-Trifosfato
<b>MAPK</b>	Proteína Quinasa Activada por Mitógenos
<b>MAPKAKP</b>	Proteína quinasa activada por MAPK
<b>MAPKK</b>	Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
<b>MAPKKK</b>	Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos
<b>MEF2</b>	Factor Potenciador de Miocitos 2 ( <i>Myocyte Enhancer Factor-2</i> )
<b>MEK</b>	Quinasa activada por Mitógenos Extracelulares
<b>miARN</b>	micro ARN
<b>MK</b>	Proteína Quinasa activada por MAPK
<b>MKP</b>	Proteína Fosfatasa Específica de MAP quinasas
<b>MLK</b>	<i>Mixed-lineage kinase</i>
<b>MNK</b>	Quinasas de interacción con MAPK
<b>MOPS</b>	3-(n-Morfolino) ácido Propanesulfónico
<b>MSK</b>	Quinasas activadas por Mitógenos y Estrés
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NES</b>	Señal de Exportación Nuclear
<b>NF-AT</b>	Factor Nuclear de células-T Activadas
<b>NF-kB</b>	Factor Nuclear-kb
<b>NGF</b>	Factor de Crecimiento Neural

<b>NLK</b>	Quinasa de tipo Nemo ( <i>Nemo-Like Kinase</i> )
<b>NLS</b>	Señal de Localización Nuclear
<b>NMDA</b>	Ácido N-Metil-D-Aspártico
<b>NPP</b>	Nucleótido Pirofosfatasa
<b>NTPDasa</b>	Nucleósido trifosfato difosfohidrolasas
<b>NTS</b>	Señal de Translocación Nuclear
<b>p38</b>	MAP quinasa p38
<b>Panx-1</b>	Panexina 1
<b>PBS</b>	Tampón Fosfato Salino
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PDGF</b>	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
<b>PEST</b>	Secuencia rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-Quinasa
<b>PKA</b>	Proteína Quinasa A
<b>PKC</b>	Proteína Quinasa C
<b>PMSF</b>	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
<b>PP</b>	Proteína Fosfatasas
<b>PPADS</b>	Piridoxalfosfato-6-Azofenil-2',4'-ácido Disulfónico
<b>PPM</b>	Proteína Fosfatasa dependiente de Metales
<b>PPP</b>	Fosfoproteína Fosfatasa
<b>PRL</b>	Fosfatasa de Regeneración Hepática
<b>PSP</b>	Proteína Serina/treonina Fosfatasa
<b>PTB</b>	Dominio de Unión a Fosfotirosina
<b>PTEN</b>	Proteína Fosfatasa Homóloga a la Tensina
<b>PTP</b>	Proteína Tirosina Fosfatasa
<b>PUM2</b>	Pumilio homólogo 2
<b>PVDF</b>	Polivinilideno Difluoruro
<b>QPCR</b>	PCR Cuantitativa
<b>RSK</b>	Quinasa Ribosomal 6
<b>RT-PCR</b>	PCR por Retrotranscripción
<b>SAP</b>	<i>Serum amyloid P</i>
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato Sódico
<b>SEM</b>	Error Estándar de la Media
<b>SH2</b>	Dominios de Homología Src 2
<b>shRNA</b>	ARN de horquilla corta ( <i>short hairpin RNA</i> )
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un Solo Nucleótido
<b>SOS</b>	<i>Son of Seveless</i>
<b>STAT3</b>	Transductor de Señales y Activador de la Transcripción 3
<b>Syk</b>	Tirosina quinasa esplénica
<b>TAK1</b>	<i>Transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>
<b>TAOK1,2</b>	Quinasa TAO 1,2
<b>TBS</b>	Tampón Salino de Trizma Base
<b>TLR</b>	<i>Toll Like Receptor</i>
<b>TM</b>	Transmembrana
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
<b>TNP-ATP</b>	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrofenil) Adenosina 5'-Trifosfato
<b>TRAF</b>	Factores Asociados al Receptor de TNF
<b>Trk</b>	Receptor tirosina quinasa
<b>TSC2</b>	Complejo de Esclerosis Tuberosa 2 ( <i>Tuberous Sclerosis Complex 2</i> )
<b>TTP</b>	Tristetraprolina
<b>UDP</b>	Uridina 5'-Difosfato

<b>USF-1</b>	<i>Upstream Stimulatory Factor 1</i>
<b>UTP</b>	Uridina 5'-Trifosfato
<b>UTPyS</b>	Uridina- 5'- O- (3- tiotrifosfato)
<b>VGAT</b>	Transportador Vesicular de GABA
<b>VGLUT</b>	Transportador Vesicular de Glutamato
<b>VH1</b>	<i>Vaccinia virus open readinng frame H1</i>
<b>VNUT</b>	Transportador Vesicular de Nucleótidos
<b><math>\alpha</math>, <math>\beta</math>-meATP</b>	$\alpha$ , $\beta$ -metilen-Adenosina-5'-Trifosfato

# Índice.

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Summary</b> .....	5
<b>Introducción</b> .....	9
<b>Proteínas quinasas activadas por mitógenos</b> .....	11
1. Las MAP quinasas convencionales .....	12
1.1. Las proteínas ERK1,2 .....	12
1.2. Las proteínas p38 .....	14
1.3. Las proteínas JNK .....	15
1.4. Las proteínas ERK5 .....	15
2. Integración de señales y especificidad de las MAP quinasas .....	16
<b>Proteínas fosfatasas</b> .....	17
1. Proteínas serina/treonina Fosfatasas (PSPs) .....	17
2. Proteínas tirosina Fosfatasas (PTPs) .....	18
2.1. Proteínas fosfatasas de especificidad dual (DUSPs) .....	19
3. Fosfatasas específicas de MAP quinasas (MKPs) .....	21
3.1. Clasificación de las MKPs .....	22
3.2. Regulación de las MKPs .....	23
3.3. Implicaciones fisiopatológicas de las MKPs .....	26
3.3.1 Papel de las MKPs en la función inmunológica .....	26
3.3.2 Papel de las MKPs en las respuestas de estrés y la homeostasis metabólica .....	27
3.3.3 Papel de las MKPs en el desarrollo .....	27
3.3.4 Papel de las MKPs en cáncer .....	27
3.3.5 Papel de las MKPs en sistema nervioso .....	28
<b>Señalización purinérgica</b> .....	31
1. Receptores purinérgicos .....	33
1.1. Receptores metabotrópicos P2Y .....	34
1.2. Receptores ionotrópicos P2X .....	37
1.2.1. El receptor P2X7 .....	40
1.2.2. Fisiología del receptor P2X7 .....	42
1.2.3. Papel del receptor P2X7 en el sistema nervioso .....	43
<b>El cerebelo</b> .....	44
1. Anatomía del cerebelo .....	44

1.1. La corteza cerebelosa .....	46
2. Avances en el estudio del cerebelo .....	48
3. Las neuronas granulares como modelo de estudio .....	50
4. Antecedentes del grupo: Señalización purinérgicas en el cerebelo .....	51
<b>Objetivos</b> .....	55
<b>Materiales y Métodos</b> .....	59
<b>Material</b> .....	61
1. Material Biológico .....	61
2. Instrumentación .....	61
3. Reactivos .....	61
<b>Métodos</b> .....	64
4. Obtención y cultivo de neuronas granulares de cerebelo .....	64
5. Tratamientos de los cultivos de neuronas granulares de cerebelo .....	66
6. Estudios de expresión génica.....	66
6.1. Obtención de las muestras .....	66
6.2. Determinación de la concentración y grado de pureza del ARN extraído..	66
6.3. Reacción de la transcriptasa reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	67
6.4. Amplificación por PCR a tiempo real (PCR cuantitativa en tiempo real) ...	68
7. Inmunotransferencia.....	69
7.1. Extracción de proteínas totales.....	69
7.2. Extracción de fracciones subcelulares.....	69
7.3. Cuantificación de proteínas .....	70
7.4. Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de membranas .....	71
8. Inmunofluorescencia .....	73
9. Ensayo de viabilidad celular basado en el metabolismo del MTT .....	73
10. Silenciamiento génico.....	74
10.1. Preparación de bacterias competentes.....	74
10.2. Transformación de bacterias y extracción de plásmidos .....	74
10.3. Transfección de células .....	75
11. Análisis estadístico de los datos.....	75
<b>Resultados</b> .....	77
1. Evolución de los niveles de fosfatasa de especificidad dual y del receptor P2X7 durante el desarrollo de neuronas granulares en cultivo .....	79
2. Los receptores P2X7 y de EGF regulan la expresión de la proteína fosfatasa DUSP6 en neuronas granulares de cerebelo de rata .....	80
2.1. Los receptores P2X7 y de EGF regulan la fosfatasa DUSP6 de manera bifásica .....	80



2.2. Las proteínas ERK1,2 regulan el recambio de la proteína DUSP6 y la expresión del gen <i>Dusp6</i> .....	85
2.3. Efecto del inhibidor de DUSP (BCI) en la señalización de MAP quinasas y fosfatasa .....	88
3. Estudios de regulación de la proteína fosfatasa de especificidad dual DUSP1 por los receptores P2X7 y de BDNF en neuronas granulares de cerebelo de rata .	93
3.1. Los receptores P2X7 y TrkB inducen la expresión génica de <i>Dusp1</i> .....	93
3.2. Análisis de la expresión de la proteína DUSP1 y su regulación por los receptores P2X7.....	95
3.3. BDNF regula los niveles de la proteína fosfatasa DUSP1 en las neuronas granulares .....	96
3.4. El BDNF promueve la fosforilación de DUSP1 de manera dependiente de ERK1,2.....	98
4. Regulación de las fosfatasa de especificidad dual por los receptores P2X7 y de BDNF en las neuronas granulares de cerebelo de ratón .....	100
4.1. Regulación de la expresión de DUSP1 y DUSP1 por el receptor P2X7 en neuronas granulares de cerebelo de ratón P2rx7-EGFP .....	100
4.2. Regulación de la expresión de DUSP6 y DUSP1 por los receptores P2X7 y TrkB en neuronas granulares de ratón C57BL/6 .....	102
4.3. Implicaciones fisiológicas de DUSP1/MKP-1 en la maduración neuronal	104
4.3.1. Efecto del silenciamiento de <i>Dusp1</i> sobre la longitud y arborización dendrítica y ramificación axonal de las neuronas granulares a 4 DIV.....	106
4.3.2. Efecto del silenciamiento de <i>Dusp1</i> sobre la longitud y arborización dendrítica y ramificación axonal de las neuronas granulares a 4 DIV .....	108
<b>Discusión</b> .....	113
1. Variaciones en los niveles de expresión de las fosfatasa DUSP1 y DUSP6 en la diferenciación del cultivo.....	115
2. Regulación bifásica de la fosfatasa DUSP6 por los receptores P2X7 y Trks ....	116
3. Estudios de regulación de la proteína fosfatasa de especificidad dual DUSP1 por los receptores P2X7 y de BDNF en neuronas granulares de cerebelo .....	120
4. Implicaciones fisiológicas de las proteínas fosfatasa DUSP6 y DUSP1 .....	125
4.1. Papel en la diferenciación y maduración de las neuronas granulares.....	125
4.2. Otras implicaciones fisiológicas de las DUSP en el sistema nervioso.....	129
<b>Conclusiones</b> .....	131
<b>Conclusions</b> .....	135
<b>Bibliografía</b> .....	139



## ***RESUMEN***



La neurotransmisión purinérgica en el cerebelo ha sido ampliamente estudiada por nuestro grupo de investigación, habiéndose caracterizado en trabajos previos las rutas de señalización activadas por los receptores de nucleótidos en neuronas granulares y astrocitos cerebelosos (Espada *et al.*, 2010; Carrasquero *et al.*, 2009; Ortega *et al.*, 2010; Ortega *et al.*, 2011). En las neuronas granulares, los receptores ionotrópicos P2X7 y los receptores metabotrópicos P2Y<sub>13</sub> ejercen efectos neuroprotectores frente a diferentes estímulos proapoptóticos, activando diversas cascadas de señalización. Entre ellas se encuentra la ruta de supervivencia que conduce a la inhibición de GSK3 (Glucógeno Sintasa Quinasa 3), bien a través de la vía canónica PI3K/Akt (Fosfatidilinositol-3-Quinasa/ Proteína Quinasa B) para el receptor P2Y<sub>13</sub>, como a través de una vía dependiente de la PKC (Proteína Quinasa C) para el receptor P2X7. Ambos receptores también activan las proteínas MAP quinasas, ERK1,2 (Quinasa regulada por señalización extracelular), señalizando a través de la CaMKII (Calcio Calmodulina Quinasa II) en el caso de P2X7, y de la vía PI3K/Akt para el receptor P2Y<sub>13</sub> (Ortega *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2009; Ortega *et al.*, 2011). En ambos casos, la activación de las proteínas ERK1,2 incrementa la fosforilación y consiguiente activación de factores de transcripción que promueven la expresión de genes implicados en la supervivencia celular y mecanismos antiapoptóticos. En estudios más recientes se ha corroborado este efecto neuroprotector frente al agente genotóxico cisplatino. Este fármaco es frecuentemente utilizado en quimioterapia para el tratamiento de tumores sólidos, con importantes efectos neurotóxicos. La estimulación de los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7, disminuía la muerte neuronal previniendo la hiperfosforilación, promovida por cisplatino, de las MAP quinasas p38 (MAP quinasa p38) y ERK1,2, respectivamente. Este efecto se conseguía mediante la inducción de la proteína fosfatasa de especificidad dual, DUSP2, que desfosforila específicamente p38 a nivel nuclear, y DUSP6 que desfosforila ERK1,2 a nivel citoplasmático (Morente *et al.*, 2014; Morente Rodríguez, 2013).

En base a estos resultados previos se plantearon como principales objetivos para este trabajo, en primer lugar, el análisis de la expresión de las fosfatasas DUSP1 y DUSP6 a lo largo del desarrollo del cultivo de las neuronas granulares. DUSP6 como ejemplo de fosfatasa citoplásmica selectiva de ERK, y DUSP1 como miembro arquetípico de las fosfatasas nucleares que también muestra especificidad frente a ERK (Dickinson y Keyse, 2006). En segundo lugar, el estudio de su regulación por los receptores P2X7 y Trks, delineando los mecanismos intracelulares implicados en dicha regulación en los modelos de neuronas granulares de cerebelo de rata y de ratón. Y finalmente, el análisis de cuáles podrían ser las posibles implicaciones fisiológicas de la regulación de estas fosfatasas en este modelo neural.

Se observó que estas fosfatasas presentaban un patrón de expresión distinto a lo largo del proceso de maduración del cultivo, los niveles de DUSP1 descendían durante la maduración neuronal. Mientras que los niveles de DUSP6 se incrementaban, alcanzando los máximos niveles de proteína entre los 6 y 10 días de cultivo, presentando un patrón coincidente con los niveles del receptor P2X7. Por este motivo se estudió la regulación de la fosfatasa DUSP6 a través de los receptores P2X7 y de EGF, empleando este último como control positivo de la modulación de DUSP6. De este modo se observó que los receptores P2X7 y de EGF regulaban los niveles de la proteína DUSP6 mostrando una cinética bifásica. Se producía una caída de los niveles de DUSP6 debida a su degradación proteasomal a tiempos cortos de estimulación con los agonistas, entre 30 minutos y 1 hora, seguida de la recuperación de los niveles basales de la proteína debida a la inducción transcripcional del gen *Dusp6* a tiempos más largos. Ambos procesos resultaron ser dependientes de la activación de ERK1,2 por estos receptores, cuyos niveles de fosforilación mostraban un patrón inverso al observado para DUSP6.



Este sistema funcionaba como un mecanismo de retroalimentación negativa mediante el cual, las proteínas ERK regulan sus propios niveles de activación a través de la fosfatasa DUSP6. Se confirmó que esta fosfatasa era la responsable de la desfosforilación de ERK1,2 a nivel citoplasmático mediante el uso del inhibidor BCI ((E)-2-Benzildieno-3-(Ciclohexilamino)-2,3-dihidro-1H-Inden-1-ona), gracias al cual también se comprobó que, basalmente, inducía un incremento en la fosforilación de las MAPKs ERK1,2 y p38, siendo el incremento de ERK responsable de la degradación de las fosfatasas DUSP1 y DUSP6 (Queipo *et al.*, 2017).

El mecanismo de regulación bifásica de DUSP6 se confirmó en neuronas granulares de cerebelo de ratón con el agonista específico P2X7, BzATP (3'-O-(4-Benzoil) benzoil Adenosine-5'-Trifosfato), y también con la neurotrofina BDNF, indicando que es una ruta de regulación universal válida para distintos tipos de efectores en distintos modelos celulares.

Por su parte, la fosfatasa nuclear DUSP1 también resultó ser regulada por el receptor P2X7 y por el receptor de BDNF, TrkB, en las neuronas granulares de rata y de ratón. Sin embargo, ambos agonistas dieron lugar a regulaciones de la fosfatasa muy distintas. El BzATP inducía un incremento transitorio de los niveles de proteína DUSP1, correspondiente a una inducción transcripcional dependiente de ERK1,2. En cambio, BDNF promovía un patrón de expresión de DUSP1 más sostenido en el tiempo, en el que participaban, no sólo la inducción transcripcional de *Dusp1*, sino también, el aumento de la estabilidad de la proteína DUSP1 mediante su fosforilación en residuos clave, siendo ambos procesos dependientes de la activación de ERK1,2. Este patrón de regulación de DUSP1 por BDNF se había descrito previamente en neuronas corticales de ratón (Jeanneteau *et al.*, 2010).

Por último, se analizó el significado fisiológico que tenía la regulación de DUSP1 por los receptores P2X7 y TrkB en la maduración de las neuronas granulares de cerebelo murino. Observamos que el silenciamiento de DUSP1 a 4 días de cultivo, promovía un crecimiento aberrante de la longitud dendrítica y axonal al estimular las neuronas con BzATP y BDNF, así como un incremento en la arborización dendrítica. Sin embargo, a estadios más diferenciados, a los 7 días en cultivo, el silenciamiento de DUSP1 tenía el efecto contrario y bloqueaba el incremento de la ramificación axónica y la arborización dendrítica promovidos por BzATP y BDNF.

De este modo se puede concluir que el receptor P2X7 y los receptores de EGF y BDNF modulan la expresión de las fosfatasas DUSP1 y DUSP6 mediante una señalización dependiente de ERK1,2, en las neuronas granulares de cerebelo de rata y de ratón. DUSP1 parece desempeñar un papel importante en el crecimiento y ramificación axonal y dendrítica a lo largo del desarrollo de las neuronas granulares, pudiendo dar lugar a distintos efectos en función del estadio de diferenciación en el que se encuentre el cultivo.

## ***SUMMARY***



Purinergic neurotransmission in the cerebellum has been widely studied by our research group, being identified several signaling pathways activated by nucleotide receptors in cerebellar granule neurons and astrocytes (Espada *et al.*, 2010; Carrasquero *et al.*, 2009; Ortega *et al.*, 2010; Ortega *et al.*, 2011). In granule neurons, P2X7 ionotropic receptor and P2Y<sub>13</sub> metabotropic receptor exert neuroprotective effects against several proapoptotic stimuli, activating different signalling pathways. These include the survival pathway leading to GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) inhibition, either through the PI3K/Akt (Phosphoinositide 3-kinase/ Protein kinase B) canonical pathway for P2Y<sub>13</sub> receptor, or through a protein kinase C-dependent pathway for the P2X7 receptor. In addition, both receptors activate the MAP Kinases, ERK1,2 (Extracellular signal-regulated kinases), through CaMKII (Calcium calmodulin kinase II) and PI3K/Akt for P2X7 and P2Y<sub>13</sub> receptors, respectively (Ortega *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2009; Ortega *et al.*, 2011). In both cases, ERK1,2 activation increases phosphorylation and subsequent activation of transcription factors that promote antiapoptotic and prosurvival gene expression. Recent studies demonstrated the neuroprotective effects against the genotoxic agent cisplatin. This drug is widely used in chemotherapy for solid tumor treatment with important neurotoxic side-effects. P2Y<sub>13</sub> and P2X7 receptor stimulation prevented neuronal death avoiding p38 and ERK1,2 hyperphosphorylation, respectively. This effect was achieved by the induction of dual-specificity phosphatases, DUSP2, which specifically dephosphorylates p38 at the nuclear level, and DUSP6, dephosphorylating ERK1,2 at the cytoplasmic compartment (Morente *et al.*, 2014; Morente Rodríguez, 2013).

Based on these findings, the main aims for this Thesis were, in the first place, to investigate the expression analysis of DUSP1 and DUSP6, during granule neuron development in culture. DUSP6 is studied as example of ERK-selective cytoplasmic phosphatase, and DUSP1 as prototypical nuclear phosphatase that also exhibits specificity towards ERK (Dickinson y Keyse, 2006). In the second place, to study DUSP1 and DUSP6 regulation by P2X7 and Trks receptors, in order to identify the intracellular mechanisms responsible for this regulation in rat and mouse cerebellar granule neurons. And in the third place, to investigate the physiological implications of DUSP phosphatases in granule neurons.

We found that these phosphatases showed different expression patterns during granule neuron maturation process. DUSP1 levels decreased along neuronal maturation, whereas DUSP6 protein was increased, reaching maximum levels at 6-10 days of culture, and showing a coincident expression pattern with P2X7 receptors. These results led to the study of the regulation of DUSP6 phosphatase by P2X7 receptor stimulation with the pharmacological agonist BzATP (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate) as well as the EGF receptor, used as a positive control of DUSP6 phosphatase regulation. P2X7 and EGF receptor stimulation modulated DUSP6 protein levels following a biphasic pattern. Short-term stimulations of 30 min – 1 hour, reduced DUSP6 protein levels, which was due to proteasomal degradation. This was followed by DUSP6 protein recovery to basal levels at long-term stimulations, which was mediated by *Dusp6* gene transcriptional induction. Both processes were dependent on ERK1,2 signalling activated by these receptors, as ERK phosphorylation levels showed an inverse pattern to that observed for DUSP6 protein levels. Therefore, DUSP6 phosphatase regulation represents a negative feedback mechanism by which ERK proteins self-regulate their own activation levels. Studies performed with DUSP inhibitor, BCI ((E)-2-Benzylenediene-3-(Cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1H-Inden-1-one),

confirmed that DUSP6 was responsible for the dephosphorylation of the ERK1,2 cytosolic pool. Cell pretreatment with the BCI inhibitor increased ERK1,2 and p38 phosphorylation levels, being ERK activation responsible of promoting DUSP1 and DUSP6 degradation (Queipo *et al.*, 2017).

The biphasic regulation of DUSP6 was reproduced in mice granule neurons with BzATP agonist and the neurotrophin BDNF, indicating that it is working as a universal regulatory mechanism validated for a plethora of effectors in different cellular models.

DUSP1 phosphatase was also under the control of P2X7 and BDNF receptors, TrkB, in rat and mice granule neurons, but showing different regulatory patterns. BzATP induced a transient increase in DUSP1 protein levels corresponding to an ERK1,2-dependent transcriptional induction of *Dusp1* gene. On the other hand, BDNF promoted a more sustained increase in DUSP1 protein levels to which contributed two different mechanisms: *Dusp1* transcriptional induction together with increased protein stability through DUSP1 phosphorylation in key residues, being both processes dependent on the ERK1,2 activation. The same DUSP1 regulation pattern elicited by BDNF in granule neurons had been previously reported in murine cortical neurons (Jeanneteau *et al.*, 2010).

Finally, the physiological consequences of DUSP1 regulation by P2X7 and TrkB receptors were analyzed in the mouse cerebellar granule neurons. DUSP1 silencing at 4 days of culture promoted an aberrant dendritic and axonal growth, which was also potentiated by BzATP and BDNF. On the other hand, at 7 days in culture, DUSP1 silencing had the opposite effect and blocked the increase in the axonal branching and dendritic arborization promoted by BzATP and BDNF.

In summary, we can conclude that P2X7, EGF and BDNF receptors modulate DUSP1 and DUSP6 expression levels through ERK1,2-dependent signalling in cerebellar granule neurons. DUSP1 seems to play an important role in axonal and dendritic growth and branching during the granule neurons development, being able to exert different effects depending on the maturation stage of the culture

# ***INTRODUCCIÓN***



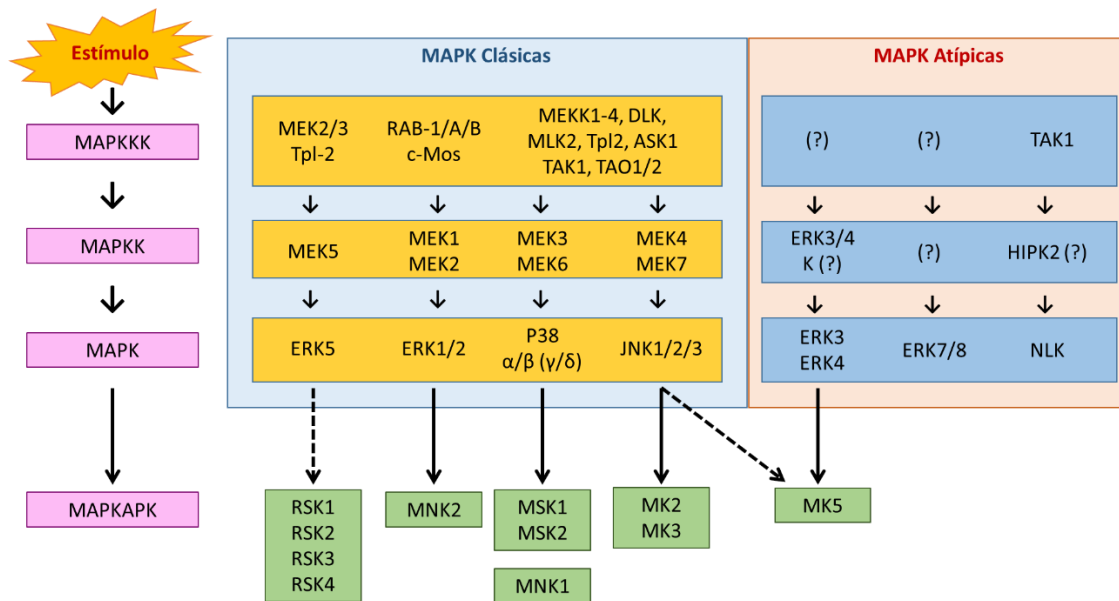
## Proteínas quinasas activadas por mitógenos.

Las MAP quinasas (Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos), también conocidas como MAPK por sus siglas en inglés, son serina/treonina quinasas, capaces de transformar estímulos extracelulares en una amplia gama de respuestas intracelulares. Estas quinasas conforman el grupo más antiguo de transductores de señales extracelulares (Widmann *et al.*, 1999). Todas las células eucariotas poseen múltiples vías de MAP quinasas, las cuales, coordinadamente, regulan la expresión génica, la mitosis, el metabolismo, la movilidad celular, la supervivencia, la apoptosis, la diferenciación y proliferación celular, y la embriogénesis. En mamíferos han sido caracterizadas 14 MAP quinasas que pueden dividirse en 7 grupos: las MAP quinasas convencionales que comprenden las quinasas reguladas por señales extracelulares o ERK1,2 (Quinasa Regulada por señalización Extracelular/*Extracellular signal-Regulated Kinases*), las JNK 1,2,3 (Quinasa de c-Jun en N-terminal 1,2,3), y las isoformas de p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ ) y ERK5. Las MAP quinasas atípicas han sido mucho menos estudiadas que las convencionales y están conformadas por ERK3,4, ERK 7 y NLK (Quinasa de tipo Nemo). En la actualidad se sabe poco aún sobre su mecanismo de activación.

Cada grupo de las MAP quinasas convencionales está compuesto por tres quinasas evolutivamente conservadas y que actúan secuencialmente: una MAPK, una MAPK quinasa (MAPKK) y una MAPKK quinasa (MAPKKK) (Figura 1). Las MAPKKK son serina/treonina quinasas y se activan a través de su fosforilación y/o como resultado de su interacción con una proteína G pequeña de la familia Ras/Rho en respuesta a un estímulo extracelular. La activación de las MAPKKKs permite la fosforilación y activación de las MAPKKs, las cuales a su vez, fosforilan y activan a las MAPKs mediante su fosforilación en residuos de treonina y tirosina situados en un dominio conservado Thr-X-Tyr localizado en el bucle del dominio quinasa VIII, siendo "X" una prolina en el caso de las JNK, una glicina en p38 y un residuo glutamato en ERK1,2 y ERK5. La fosforilación de estos residuos es esencial para su actividad enzimática, si no están ambos fosforilados no se produce la activación de la MAPK. En el caso concreto de ERK1,2, la tirosina es fosforilada antes que la treonina. Mientras está fosforilada sólo la tirosina, se mantienen acumuladas de manera inactiva hasta que superan un umbral, en ese momento se comienza a fosforilar la treonina y se activan rápidamente.

Existe un amplio rango de funciones mediadas por las MAPKs a través de la fosforilación de distintos sustratos, incluyendo miembros de la familia de las proteína quinasas denominadas MAPKAPK (Proteínas Quinasas Activadas por MAPK/ *MAPK Activated Protein Kinases*) (Gaestel, 2008; Roux y Blenis, 2004). Esta familia comprende las proteínas RSKs (Quinasas Ribosomales), proteínas p90<sup>rsk</sup> (p90 quinasa ribosomal S6) (Carriere *et al.*, 2008), las proteínas MSKs (Quinasas Activadas por Mitógenos y Estrés) (Arthur, 2008), las proteínas MNKs (Quinasas de Interacción con MAPK) (Buxade *et al.*, 2008), las MK2,3 (Proteína Quinasa Activada por MAPK 2,3) (Ronkina *et al.*, 2008), y MK5 (Proteína Quinasa Activada por MAPK 5) (Perander *et al.*, 2008) (Figura 1).





**Figura 1. Cascadas de señalización de las proteínas MAP quinasas.** La activación de las MAPKs permite la activación de las MAPKAPKs. Los mitógenos, las citoquinas y los estresores celulares promueven la activación de distintas rutas de señalización a través de las MAPKs, las cuales a su vez fosforilan y activan 5 grupos de MAPKAPKs, incluyendo RSK, MSK, MNK, MK2/3, y MK5. Las líneas discontinuas indican que la regulación de sustrato por la respectiva quinasa sigue sin estar completamente demostrada. Las isoformas  $\gamma$  y  $\delta$  de p38 están entre paréntesis indicando que no han demostrado promover la activación de las MAPKAPKs. Imagen adaptada de (Cargnello y Roux, 2011).

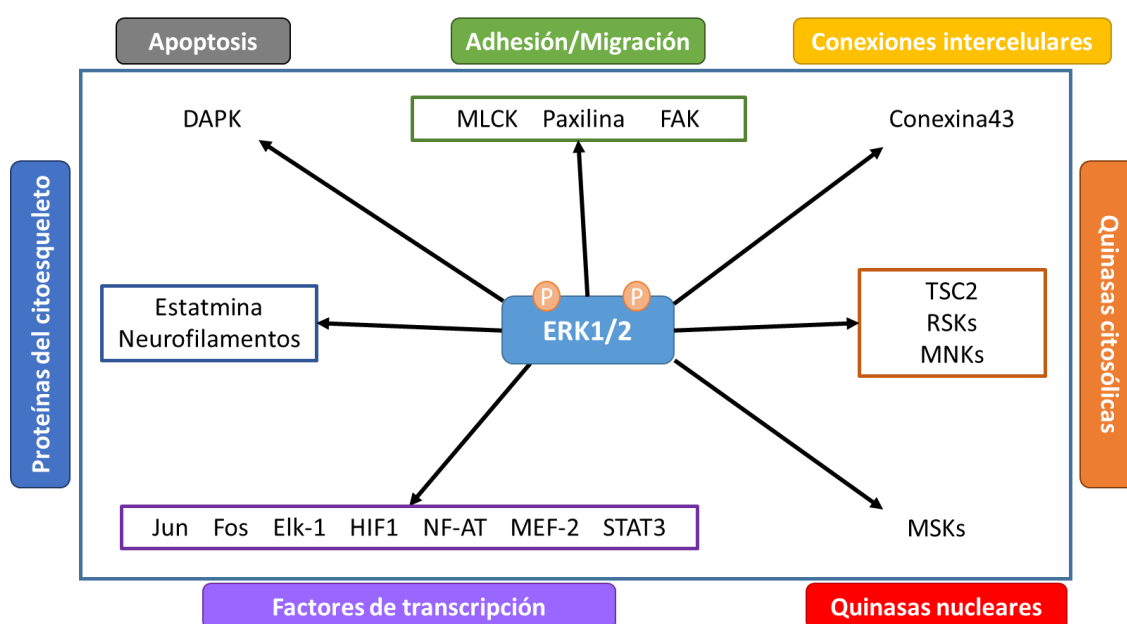
## 1. Las proteínas MAP quinasas convencionales.

### 1.1. Las proteínas ERK1,2.

ERK1 y ERK2, también denominadas p42 y p44 respectivamente, son dos quinasas que muestran un 83% de homología en su estructura primaria. Se expresan en numerosos tejidos, siendo especialmente abundantes en el cerebro, el músculo esquelético, el timo y el corazón. Son activadas principalmente por factores de crecimiento como PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas), EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) y NGF (Factor de Crecimiento Neural) y en respuesta a insulina, aunque también se pueden activar por ligandos de GPCRs (Receptores Acoplados a Proteínas G), citoquinas, estrés osmótico y desorganización de los microtúbulos, así como por canales iónicos (Rane, 1999; Raman *et al.*, 2007).

La activación de las proteínas ERK se produce principalmente por la activación de receptores de membrana de tipo tirosina quinasa denominados Trks. El ligando induce la dimerización del receptor y la autofosforilación cruzada de los residuos de tirosina en el dominio intracelular del receptor. Estos dominios fosforilados sirven como sitios de unión para proteínas con dominios SH2 (Src Homology 2) o PTB (de Unión a Fosfotirosina), como Grb2 (Proteína de unión a Receptores de Factores de Crecimiento 2), que puede reclutar a SOS (*Son of Sevenless*). A su vez, Grb2, que es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina, es capaz de activar a Ras a través del intercambio de GDP por GTP. Ras activaría a la MAPKKK Raf (A-Raf, B-Raf o Raf-1), la cual es capaz de unirse y fosforilar a las MAPKK MEK1 y MEK2 (Quinasas Activadas por Mitógenos Extracelulares 1 y 2), para finalmente activar a ERK1,2 mediante fosforilación.

En células quiescentes, todos los componentes de la cascada de señalización de ERK1,2 permanecen en el citoplasma, pero tras una estimulación celular, parte de las ERK1,2 se translocan al núcleo, gracias a la presencia de una secuencia NTS (Señal de Translocación Nuclear) (Zehorai *et al.*, 2010). La fosforilación en este dominio permite la interacción de ERK1,2 con la importina 7 y su paso al núcleo. A nivel citoplasmático ERK puede fosforilar varios sustratos, como DAPK (Proteína Quinasa Asociada a Muerte / *Death Associated Protein Kinase*), TSC2 (Complejo de Esclerosis Tuberosa 2), RSK (Quinasa Ribosomal 6) y MNK (*MAPK iNteracting Kinase*), así como otras proteínas asociadas con la membrana, como CD120a (*Cluster of Differentiation 120a*), Syk (Tirosina quinasa esplénica) y calnexina, o con el citoesqueleto, como neurofilamentos y paxilina. A nivel nuclear, puede fosforilar y activar diversos factores de transcripción, como NF-AT (Factor Nuclear de células-T Activadas), Elk-1 (*ETS Like-1 protein*), MEF2 (Factor Potenciador de Miocitos 2,) cFos, c-Myc y STAT3 (Transductor de Señales y Activador de la Transcripción 3) (Cargnello *et al.*, 2012). Las proteínas o elementos de señalización que actúan como sustratos de las proteínas ERK las relacionan con distintas funciones fisiológicas, que van desde el mantenimiento de la supervivencia celular hasta la remodelación del citoesqueleto, la migración, la regulación del ciclo celular, etc (Figura 2).



**Figura 2. Principales dianas de las proteínas ERK1,2.** Las proteínas ERK1,2 están implicadas en la regulación de múltiples procesos celulares a través de la regulación por fosforilación de distintas proteínas, teniendo un papel importante en la regulación de la supervivencia celular, de la migración, del establecimiento de contactos intracelulares y de la dinámica del citoesqueleto. Asimismo, controlan la actividad de múltiples factores de transcripción y de proteínas de localización nuclear, teniendo también un papel importante en la regulación de la expresión de diversos genes. Imagen adaptada de (Ramos, 2008)

## 1.2. Las proteínas p38.

El miembro arquetípico de este módulo de señalización es p38 $\alpha$ , que es generalmente la isoforma de respuesta más potente frente a estímulos estresantes, aunque existen otras 3 isoformas, p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ . Mientras que p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  están ubicuamente expresadas en líneas celulares y tejidos, p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  presentan patrones de expresión más restringidos y podrían tener funciones más especializadas (Li *et al.*, 1996).

Las cuatro isoformas de p38 son potentemente activadas por varios factores de estrés ambiental, incluyendo estrés oxidativo, irradiación ultravioleta, hipoxia e isquemia, así como por citoquinas inflamatorias Il-1 (Interleuquina-1) y TNF $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$ ). Estos dos últimos activan p38 promoviendo el reclutamiento de las proteínas adaptadoras TRAF (Factores Asociados al Receptor de TNF) desde sus dominios intracelulares hacia los receptores (Bradley y Pober, 2001). El reclutamiento de TRAF promueve la activación de varias MAPKKK implicadas en la activación de las distintas isoformas de p38. También puede activarse esta ruta de señalización a través de la activación de GPCRs (Goldsmith y Dhanasekaran, 2007) y por proteínas G monoméricas como la GTPasa de las familias Rho, Rac y Cdc42 (Proteína de control de la división celular 42) (Bagrodia *et al.*, 1995).

MEK3 y MEK6 (Quinasas activada por Mitógenos Extracelulares 3 y 6) son las MAPKK más importantes en la activación de las isoformas de p38 (Derijard *et al.*, 1995). Mientras MEK6 activa todas las isoformas de p38, MEK3 es más selectiva y fosforila preferentemente las isoformas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ .

Las distintas isoformas de p38 se encuentran presentes tanto en núcleo como en citoplasma en células quiescentes (Ben-Levy *et al.*, 1998) y parecen acumularse en el núcleo bajo ciertos estímulos de estrés (Raingeaud *et al.*, 1995). Aunque los mecanismos implicados en el paso de p38 al núcleo aún se desconocen, aunque las proteínas MK2, MK3 y MK5 parecen ser importantes para su anclaje a nivel citoplásmico (Gaestel, 2006). Tras la estimulación, las isoformas de p38 pueden fosforilar a un amplio número de sustratos en distintos compartimentos celulares. A nivel citoplasmático tienen como sustratos la cPLA2 (Fosfolipasa 2), MNK1,2, MK2,3, la proteína de unión a ARN, HuR (Antígeno Humano R), la proteína apoptótica Bax (Proteína X asociada a Bcl2) y la proteína de unión a los microtúbulos Tau. Y a nivel nuclear los factores de transcripción ATF1,2,6 (Factor Activador de la Transcripción 1, 2 y 6), MEF2, Elk1, GADD153 (Detención del crecimiento y daño en el ADN), Ets1, p53 y MSK1,2 (Cuadrado y Nebreda, 2010).

Particularmente, p38 juega un papel crucial en las respuestas inmunes e inflamatorias. p38 es activada por numerosos mediadores extracelulares de inflamación, incluyendo quimioatrayentes, citoquinas, quimioquinas y el LPS (Lipopolisacárido bacteriano). Una de las principales funciones de p38 es la producción de citoquinas proinflamatorias a través de la modulación de factores de transcripción como NF $\kappa$ B (Factor Nuclear  $\kappa$  B) (Karin, 2006), o a nivel de ARN mensajero, modulando su estabilidad y su traducción a través de MNK1 (Buxade *et al.*, 2008) y MK2/3 (Ronkina *et al.*, 2008).

La proteína p38 también resulta importante en los procesos de proliferación y supervivencia celular mediante la regulación del ciclo celular. Pese a que en algunos casos esté descrito como un factor prosupervivencia, p38 se encuentra mucho más asociada a la inducción de la apoptosis por estrés celular a través de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales que afectan a receptores de muerte celular, vías de supervivencia y proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl2 (Linfoma de células B 2) (Cuenda y Rousseau, 2007).

### 1.3. Las proteínas JNK.

La familia JNK (también denominadas proteínas quinasas activadas por estrés, *Stress Activated Protein Kinase*, SAPK), está compuesta por 3 isoformas: JNK1, JNK2 y JNK3, también conocidas como SAPK $\gamma$ , SAPK $\alpha$  y SAPK $\beta$ , respectivamente. JNK1 y JNK2 presentan una amplia distribución en tejidos, mientras que JNK3 parece estar localizada principalmente en tejido neuronal, testículos y miocitos cardíacos (Bode y Dong, 2007).

Las distintas isoformas de JNK responden a varios estímulos de estrés de la célula como choque térmico, radiación ionizante, estrés oxidativo, agentes que promueven daño en el ADN, citoquinas, radiación ultravioleta, inhibidores de la síntesis de ADN y proteínas y privación de factores de crecimiento, y de una manera menos potente a factores de crecimiento, algunos ligandos de receptores acoplados a proteínas G y a suero (Bogoyevitch *et al.*, 2010). Las MAPKKs capaces de activar a JNK son MEK4 y MEK7, que parecen cooperar en la fosforilación y activación de JNK. A su vez, las proteínas MEK4/7 son fosforiladas y activadas por múltiples MAPKKK que incluyen MEKK1-4, MLK1-3 (*mixed-lineage kinase*), DLK (*Dual Leucine Zipper Kinase*), TAOK1,2 (TAO Quinasa 1,2), TAK1 (*Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1*) y ASK1/2 (Quinasa reguladora de la Señal de Apoptosis 1/2) (Kyriakis y Avruch, 2001; Wagner y Nebreda, 2009).

Al igual que ocurre con ERK1,2 y p38, una proporción de JNKs activadas parecen translocarse del citoplasma al núcleo tras la estimulación celular (Mizukami *et al.*, 1997). Como principal sustrato destaca el factor de transcripción c-Jun, aunque JNK son capaces de fosforilar a otros factores de transcripción como p53, ATF-2 (Factor Activador de la Transcripción 2), NF-ATc1, Elk1, HSF-1 (Factor de Choque Térmico 1), STAT3, c-Myc y JunB (Bogoyevitch *et al.*, 2010; Raman *et al.*, 2007). Sin embargo, poco se conoce acerca de sus sustratos citoplasmáticos (Cargnello y Roux, 2011).

### 1.4. Las proteínas ERK5.

Se trata de una de las cascadas de señalización menos estudiadas dentro de las MAP quinasas convencionales. Actualmente se sabe que esta ruta se activa mediante estrés oxidativo e hiperosmolaridad (Lee *et al.*, 1995), así como por mitógenos (Kato *et al.*, 1997), si bien los mecanismos de activación aún no están del todo esclarecidos. Se postula que las MAPKKKs fosforilan a isoformas de MEK5, que a su vez fosforilan a ERK5. Esta MAPK tiene localización citoplasmática y se transloca al núcleo tras su estimulación (Kondoh *et al.*, 2006). Como sustratos destacan factores de transcripción como c-Myc (English *et al.*, 1998), MEF2 (Yang *et al.*, 1998), c-Fos (Kamakura *et al.*, 1999), y SAP1a (*serum amyloid P*) (Suzaki *et al.*, 2002), aunque en algunas ocasiones parece que ERK5 puede actuar por sí mismo como factor de transcripción (Kasler *et al.*, 2000).

## 2. Integración de las señales y especificidad de las MAP quinasas.

Cada cascada de señalización de las MAP quinasas está implicada en la mediación y regulación de un amplio número de procesos celulares, en algunos casos incluso contradictorios, como la supervivencia/apoptosis y la diferenciación/proliferación celular. Esta diversidad es debida a la especificidad de cómo está regulada cada una de las 4 cascadas de señalización. Pese a que los sitios de fosforilación y los dominios de interacción proteína-proteína parecen estar compartidos por todas las MAPKs, cada vía de señalización de las MAPKs fosforila distintos sustratos: se han descrito más de 160 sustratos exclusivos de ERK1,2, y el número de sustratos para p38 y JNK podría ser similar. No obstante, actualmente se han propuesto 5 mecanismos por los cuales se produce la especificidad de señal de estas vías de señalización y que se describen a continuación.

*-Distinta duración y fuerza de la señal.* Se trata del primer mecanismo que se ha propuesto para resolver la especificidad de la señalización de las MAP quinasas. Se requiere la fosforilación de los residuos de treonina y de tirosina simultáneamente para la activación de las MAPKs, con la desfosforilación de tan sólo uno de esos residuos se perdería su actividad catalítica. Así las proteínas serina/treonina fosfatasas, las tirosina fosfatasas clásicas, así como fosfatasas de especificidad dual, jugarían un papel muy importante en la modulación de la señalización de las MAPKs, regulando la intensidad y duración de las señales.

*-Interacciones con proteínas de andamiaje* que agrupan distintos escalones de la cascada de señalización, formando complejos proteicos. Estas proteínas de andamiaje tendrían distintas funciones como:

- Facilitar la velocidad de activación al aproximar la quinasa con su sustrato.
- Determinar la especificidad de la señal mediante la formación de complejos con proteínas que determinen el destino de la ruta.
- Dirigir a las MAPKs a una localización subcelular determinada para que ejerzan su efecto a ese nivel.
- Estabilizar las MAPKs protegiéndolas de la acción de proteasas y fosfatasas.
- Establecer un umbral crítico de señalización/activación.

*-Interacciones entre cascadas de MAPKs o con otras vías de señalización* que son activadas o inhibidas simultáneamente con las cascadas de las MAP quinasas.

*-Distintas localizaciones subcelulares* que podrían compartimentalizar los componentes de las cascadas de las MAPKs y sus dianas en ciertos orgánulos intracelulares u otras regiones intracelulares.

*- La presencia de complejos multiproteicos con distintas especificidades* en cada nivel de la cascada (Keshet y Seger, 2010).

## Proteínas fosfatasas.

Como se ha comentado anteriormente, la duración y amplitud de la activación de las cascadas de las MAP quinasas representan el balance entre la señal de activación y los mecanismos de inactivación que regulan estas cascadas. En este proceso de modulación cobra especial importancia la inactivación de las MAPKs por desfosforilación (Keshet y Seger, 2010), que puede ejercer un control sobre la señalización de las MAPKs mucho más potente que la regulación por las quinasas que se encuentran por encima en la cascada de señalización. Esto se debe a que, si bien es necesaria la fosforilación en los residuos de treonina y tirosina (T-X-Y) del bucle de fosforilación del dominio VIII para ser activas, su completa inactivación puede ser llevada a cabo a través de la desfosforilación de uno sólo de esos residuos reguladores. De este modo, contribuyen tres familias de proteínas fosfatasas, las PSPs (Proteína Serina/Treonina Fosfatasas), las PTPs (Proteínas Tirosina Fosfatasas), y las DUSPs (Proteínas Fosfatasas de Especificidad Dual), para determinar la intensidad y la duración de la señal de MAPKs de una manera muy importante a nivel intracelular (Peti y Page, 2013). Dentro de las DUSPs cabe destacar un grupo de fosfatasas específicas de MAPK denominadas MKPs, (Fosfatasas Específicas de MAPK) en las que se enfoca el estudio del presente trabajo y que detallaremos minuciosamente más adelante.

### 1. Proteínas serina/treonina fosfatasas (PSPs).

Las proteínas serina/treonina fosfatasas son enzimas capaces de desfosforilar residuos de serina/treonina y comprenden tres grandes familias: las PPPs (Fosfoproteínas Fosfatasas), las PPMs (Proteínas Fosfatasas dependientes de Metales), y las fosfatasas basadas en aspartato, representadas por FCP/SCP.

En un gran número de PPPs, la subunidad catalítica se encuentra asociada a una gran variedad de subunidades reguladoras. Los miembros más representativos de la familia de las PPPs incluyen a las PP (Proteínas Fosfatasas) PP1, PP2A y PP2B, esta última también conocida como calcineurina, y las proteínas PP4, PP5, PP6 y PP7. Dentro de la familia de las PPM se incluyen proteínas fosfatasas dependientes de manganeso/magnesio ( $Mn^{2+}/Mg^{2+}$ ) como PP2C y la piruvato deshidrogenasa fosfatasa. Para PPPs y PPMs los iones metálicos juegan un importante papel a nivel catalítico. Por el contrario, las FCP/SCP reconocen el sustrato a través de su dominio C-terminal que contiene repeticiones en tándem de un heptapéptido rico en serinas (Shi, 2009).

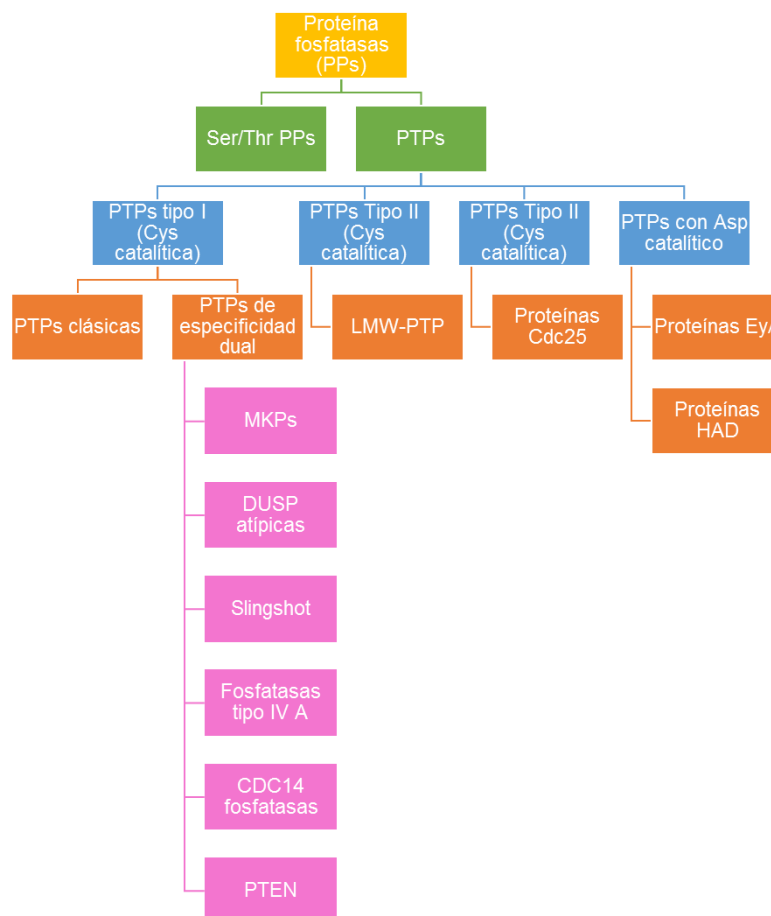
Las proteínas fosfatasas se clasifican en dos grupos: grupo 1, denominado PP1 y tipo 2, denominado PP2, que engloba a su vez a PP2A, PP2B y PP2C (Ingebritsen y Cohen, 1983). PP1 se encuentra ubicuamente expresada en células eucariotas y participa en una amplia gama de procesos celulares, incluyendo la meiosis y división celular, apoptosis, síntesis proteica, metabolismo, reorganización del citoesqueleto y la regulación de los receptores y canales de membrana (Ceulemans y Bollen, 2004; Munro *et al.*, 2002). PP2A está implicada en procesos celulares importantes como el desarrollo, la proliferación y la muerte celular, la movilidad celular, la dinámica del citoesqueleto, el control del ciclo celular y la regulación de numerosas vías de señalización (Janssens y Goris, 2001). Por su lado, PP2B o calcineurina juega un importante papel en numerosos procesos celulares dependientes de calcio, como es el caso de la memoria, el neurodesarrollo, la respuesta inmune, hipertrofia cardíaca, transducción de señales intracelulares, y desarrollo muscular (Rusnak y Mertz, 2000). Por último, PP2C pertenece a la familia de las PPMs. Al contrario que las PPPs, es resistente a la inhibición con ácido okadaico o microcistina y representa una amplia familia de proteína



fosfatasa, ya que existen 16 genes distintos de PP2C en el genoma humano (Lammers y Lavi, 2007), sus principales funciones consisten en la regulación de la señalización por estrés, diferenciación celular, crecimiento celular, supervivencia, apoptosis y metabolismo (Wang *et al.*, 2008).

## 2. Proteínas tirosina fosfatasa (PTPs).

Las proteínas tirosina fosfatasa forman un amplio grupo de fosfatasa, constituido por un total de 107 genes, frente a los, aproximadamente, 30 que conforman la familia de las PSPs. Las PTPs pueden ser agrupadas en 4 subfamilias en función de su secuencia aminoacídica y de sus dominios catalíticos (Alonso *et al.*, 2004; Mustelin, 2006). La primera familia, y la mayor de ellas, incluye las PTPs de tipo I basadas en cisteína. Estas fosfatasa, a su vez, se pueden dividir en dos subgrupos en función de su similitud en el dominio catalítico, englobando así las PTPs clásicas específicas de tirosina y el heterogéneo grupo de las fosfatasa de especificidad dual, DUSP (Figura 3).



**Figura 3. Clasificación de las proteínas fosfatasa basada en su especificidad de sustrato y estructura.** El significado de las abreviaturas es el siguiente: PP (*Protein Phosphatase*, proteína fosfatasa), PTP (Proteína Tirosina Fosfatasa), Ser/Thr (serina-treonina), HAD (Holoácido Deshalogenasa), LMWPTP (Proteínas Fosfatasa de Bajo Peso Molecular). Las fosfatasa de especificidad dual se clasifican en 6 grandes grupos: MKPs o Fosfatasa específicas de MAPK, Fosfatasa de especificidad dual atípicas, Proteínas fosfatasa de tipo Slingshot, Proteína tirosina fosfatasa tipo IV A, CDC14 fosfatasa, Proteínas fosfatasa PTEN (Proteína Fosfatasa Homóloga a la Tensina). Estos datos se han adaptado de HUGO Gene Nomenclature Committee. Imagen adaptada de (Schmoll *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2009).

La segunda subfamilia PTP contiene sólo una fosfatasa, LMWPTP (PTP de Bajo Peso Molecular) que forma el tipo II, específica de tirosina y basada en cisteína. Está relacionada con fosfatasa de bajo peso molecular de bacterias que están conservadas

evolutivamente (Alonso *et al.*, 2004; Mustelin, 2006). La tercera familia de PTPs está compuesta por las fosfatasa de tipo II relativas a la rodanasa y basadas en cisteína, que además son específicas de tirosina y treonina. Este grupo está compuesto por tres reguladores del ciclo celular: Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C (Russell y Nurse, 1986; Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006).

La cuarta subfamilia está conformada por las PTPs basadas en ácido aspártico y engloban la fosfatasa específica de tirosina EyA (*Eyes Absent* u ojos ausentes) y la familia HAD (Holoácido Deshalogenasa) (Mustelin, 2006; Moorhead *et al.*, 2007).

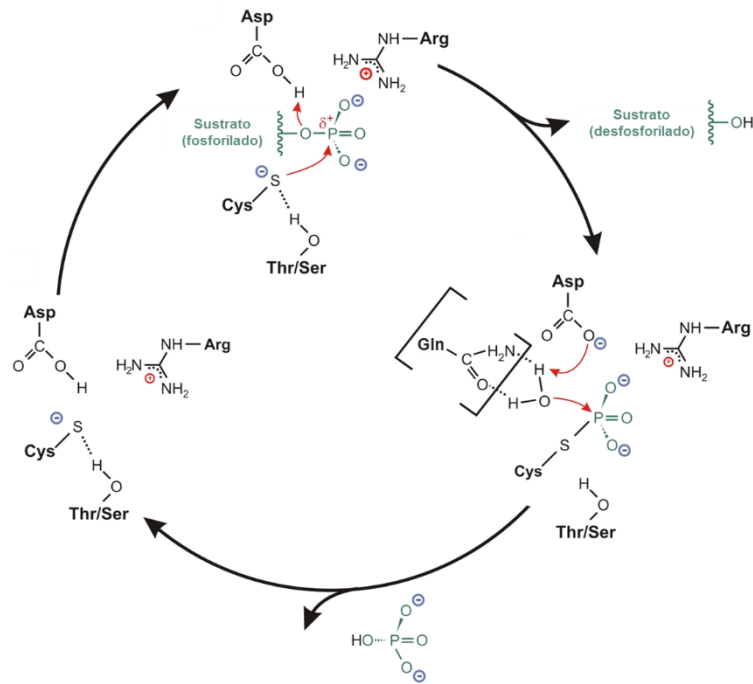
## 2.1. Proteínas fosfatasa de especificidad dual (DUSPs).

La familia de las proteínas DUSP está compuesta por un amplio y heterogéneo subgrupo de proteínas fosfatasa de tipo I basadas en cisteína, de la superfamilia de las PTPs. La principal característica de estas fosfatasa es su capacidad de desfosforilar residuos tanto de serina/treonina como de tirosina en sus sustratos. Esta habilidad es atribuida a su hendidura enzimática flexible y poco profunda que es capaz de acomodar a ambos tipos de residuos indistintamente (Farooq y Zhou, 2004). Presentan, al igual que las PTPs clásicas, un mecanismo de desfosforilación basado en la hidrólisis del grupo fosfato que implica la formación de un intermediario estable fosforilado de la enzima (Denu y Dixon, 1998). Este intermediario estable presenta una fosforilación de la cisteína catalítica formando un enlace covalente tiol-fosfato (Rios *et al.*, 2014). El dominio catalítico está altamente conservado y contiene la secuencia consenso HCXXXXXR con el residuo crítico de cisteína situado en la base de la hendidura catalítica y el residuo de arginina plegado sobre el bolsillo de unión al fosfato para asistir a la catálisis. También hay un residuo de aspartato conservado que actúa como catalizador ácido-base y ayuda a estabilizar el intermediario fosforilado, el cual protona al ion fenolato durante la formación del intermediario y podría actuar como base general durante el mecanismo de hidrólisis (Denu y Dixon, 1998) (Figura 4).

Existen 61 DUSPs con formas y funciones heterogéneas, que pueden ser agrupadas en base a la presencia de dominios específicos y similitud de secuencia en varios grupos. Las Slingshot están representadas por 3 genes (SSH1L, SSH2L y SSH3L), pero su papel biológico y su regulación se conocen poco, se sabe que son responsables de la desfosforilación de proteínas del grupo ADF/cofilina (Factor despolimerizador de actina), y por tanto podrían estar implicadas en la polimerización de la actina (Niwa *et al.*, 2002; Ohta *et al.*, 2003).

Las PRL o Fosfatasa de Regeneración Hepática se han relacionado ampliamente con la metástasis de distintos tipos de cáncer, pero sus funciones biológicas y sus sustratos fisiológicos son poco conocidos. (Bessette *et al.*, 2008). Del mismo modo, las fosfatasa de tipo CDC14 también se han relacionado con cáncer, concretamente con glioblastomas malignos. Su principal función consiste en desfosforilar CDKs (Quinasa Dependiente de Ciclinas) específicas y regular la mitosis y la salida del ciclo celular (Visintin *et al.*, 1998).





**Figura 4. Mecanismo catalítico de las proteínas fosfatasa de especificidad dual.** En estado de reposo, el azufre de la cisteína catalítica permanece estabilizado en la forma tiolato a través de la formación de un puente de Hidrógeno entre el azufre y el grupo hidroxilo de la serina o treonina del bucle-P. Para la unión al sustrato, la arginina localizada en el bucle P resulta clave, estabilizando la correcta colocación del sustrato en el centro activo. El tiolato actúa como nucleófilo, atacando el grupo fosfato, y mediante una reacción de adición-eliminación, da lugar a la formación de un intermediario cisteinil-fosfato. El intermediario se ve estabilizado por la formación de un puente de hidrógeno con un residuo de aspártico y por una interacción iónica con un residuo de arginina, ambos localizados en el centro activo. Tras esto, el sustrato se disocia, ya desfosforilado, del centro activo. La hidrólisis del intermediario enzimático cisteinil-fosfato requiere la participación de una molécula de agua. Para ello, el residuo de aspártico actúa como aceptor de protones de la molécula de agua que ha sido activada previamente por un residuo de glutamina. Tras ceder el protón, el fosfato se disocia de la cisteína catalítica, volviendo la enzima al estado de reposo. Imagen adaptada de (Hobiger y Friedrich, 2015).

Por su parte, existen 5 fosfatasa del tipo PTEN y su principal función consiste en desfosforilar fosfolípidos de inositol. PTEN resulta ser una fosfatasa especialmente importante ya que se encuentra frecuentemente mutada, silenciada o eliminada en muchos tipos de cáncer, permitiendo la pérdida de función y una proliferación aberrante de las células. Las miotubularinas también desfosforilan fosfolípidos de inositol al igual que PTEN, sin embargo no se comprende completamente su papel fisiológico, ya que la mitad de las miotubularinas son catalíticamente inactivas, no obstante las mutaciones en estas proteínas se han relacionado con enfermedades neuromusculares (Wishart y Dixon, 2002; Kim *et al.*, 2002).

Actualmente existen descritos 25 genes que tienen la designación *DUSP* según la Organización Genoma Humano, denominados de *DUSP1-28*, siendo redundantes los genes *DUSP17*, *DUSP20* y *DUSP23*, que se denominan también *DUSP19*, *DUSP18* y *DUSP25*, respectivamente. Dentro de estas 25 *DUSPs*, MS-STYX/*DUSP24* y *DUSP27* no contienen el residuo nucleofílico en el centro catalítico de la enzima, que se encuentra sustituido por una serina, habiendo perdido su actividad catalítica. Las *DUSPs* se pueden clasificar en función de si en su secuencia presentan el dominio de unión a las MAP quinasas (Kim *et al.*, 2002) o no. Aquellas *DUSP* que carecen de este dominio son generalmente agrupadas como *DUSP* atípicas, mientras que las que lo conservan son

clasificadas como DUSP típicas o MKPs (MAP quinasas Fosfatasa). Aunque existen algunas excepciones, como MKP6/DUSP14, JKAP/DUSP22 y MKP8/DUSP26, que son DUSP atípicas al carecer del dominio KIM (de Interacción con Quinasas) pero reciben la nomenclatura de MKPs, o el caso de PAC1/DUSP2, HVH3/DUSP5 o HVH-5/DUSP8, que conteniendo el dominio KIM carecen de la denominación MKP, pese a formar parte del grupo de las MKPs (Huang y Tan, 2012).

Existen 16 DUSP atípicas, que muestran algunas características comunes con las MKPs, como su similitud con la fosfatasa VH1 (*Vaccinia virus open reading frame H1*) del virus *Vaccinia*, sin embargo, carecen de un ancestro común y filogenéticamente son muy distintas de las PTPs clásicas y de las MKPs. Además, no presentan selectividad exclusiva por las MAPKs. Dentro de este grupo, cabe destacar la fosfatasa Laforina, principal responsable de la epilepsia progresiva mioclónica de Lafora. Se trata de una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la acumulación de inclusiones de poliglucosanos intracelulares denominadas cuerpos de Lafora. Esta enfermedad se produce por mutaciones en el gen EPM2A que codifica la Laforina (Aoki *et al.*, 2001; Ganesh *et al.*, 2006; Gentry *et al.*, 2018). A continuación, describiremos con mayor detalle las MKPs.

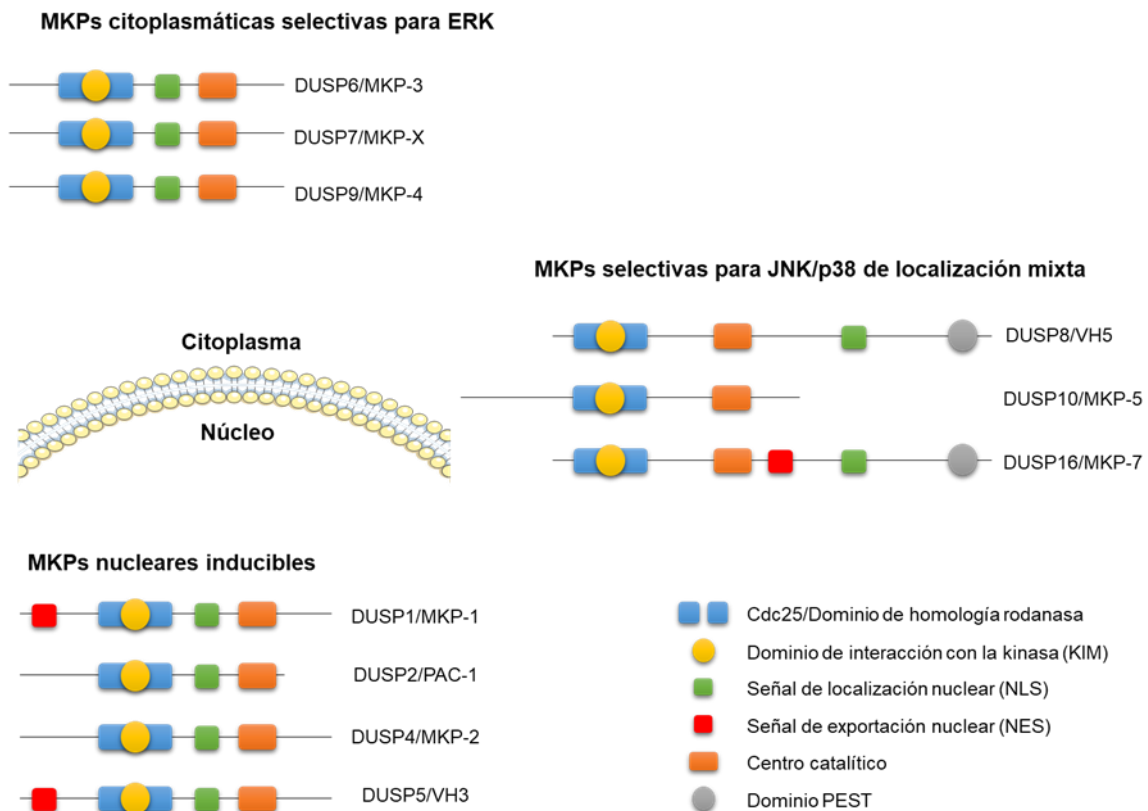
### 3. Fosfatasa específica de las MAP quinasas (MKPs).

Uno de los grupos de proteínas DUSP mejor caracterizados son las MKPs. Está formado por 10 proteínas fosfatasa que tienen como sustrato específico la fosfotreonina y la fosfotirosina del bucle de activación de las MAPKs. Las MKPs poseen un dominio catalítico localizado en la región del C-terminal altamente conservado, que contiene la secuencia consenso extendida **DX26(V/L)X(V/I)HCXAG(I/V)SRST(I/V)XXAY(L/I)M** donde X puede ser cualquier aminoácido y siendo los aminoácidos en negrita los residuos críticos para la catálisis (Patterson *et al.*, 2009). El dominio del centro activo se encuentra relacionado con la secuencia prototípica VH1 de la proteína fosfatasa de especificidad dual del virus *Vaccinia* (Camps *et al.*, 2000; Keyse, 2000).

Las MKPs en el dominio N-terminal o no catalítico contienen dos regiones de homología con la proteína Cdc25 (fosfatasa reguladora del ciclo celular), también denominado tipo rodanasa, debido a la similitud estructural que comparte con esta familia de sulfotransferasas (Keyse y Ginsburg, 1993; Bordo y Bork, 2002). En esta región N-terminal nos encontramos con el dominio de interacción con las quinasas, KIM, que es el encargado de conferir especificidad de sustrato a las MKPs (Figura 5). El núcleo de KIM se caracteriza por la presencia de un grupo de 2-3 residuos de arginina cargados positivamente y flanqueados por residuos hidrofóbicos (Leu, Ile y Val), conformando un dominio de unión modular en el cual, la variación en el número y posición de los aminoácidos cargados positivamente y los aminoácidos hidrofóbicos contribuyen a la especificidad de sustrato de MAPK (Tanoue *et al.*, 2002). Estos motivos se engranan a través de un dominio de acoplamiento común ("common docking" o CD) conformado por residuos de aspártico cargados negativamente y una secuencia adicional determinante, que incluye el sitio denominado ED (Glu160 y Asp161 para p38, Thr157 y Thr158 para ERK2) y una ranura de acoplamiento para la MAPK (Tanoue *et al.*, 2002; Tanoue *et al.*, 2001).

Además, algunas fosfatasa presentan un dominio denominado PEST (secuencia rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina) en la región C-terminal. Su principal función es desarrollar un papel regulador de la estabilidad de la fosfatasa, ya que la presencia o ausencia de este dominio determina la estabilidad de la enzima. Estas

fosfatases también pueden presentar dominios NLS (de Localización Nuclear) o NES (de Exportación Nuclear) que configuran su localización subcelular (Farooq y Zhou, 2004). Gracias a la variabilidad de estos dominios que conforman la estructura de las MKPs se encuentran fosfatases con distintas preferencias de sustrato dentro de las MAPKs gracias a la variabilidad del dominio KIM, así como MKPs con distintas localizaciones subcelulares, por los dominios NES y NLS, y distintos modos de regulación/estabilización por sitios de fosforilación o la presencia del dominio PEST (Figura 5).



**Figura 5. Clasificación, localización subcelular y estructura de las MKPs.** Las tres clases de MKPs se han agrupado de acuerdo a su localización, especificidad de sustrato y similitud de secuencia. Las fosfatases que muestran preferencia por JNK/p38 se encuentran distribuidas entre el núcleo y el citoplasma, de modo que no han sido representadas por selectividad de sustrato. La leyenda para identificar la simbología de los dominios que constituyen la estructura de las fosfatases se encuentra detallada en la esquina inferior derecha. Imagen adaptada de (Caunt y Keyse, 2013).

### 3.1. Clasificación de las MKPs.

En base a la secuencia génica y similitud de secuencia aminoacídica, así como a su estructura y localización subcelular, las 10 MKPs pueden ser divididas en 3 clases (Theodosiou y Ashworth, 2002): La primera clase corresponde a aquellas fosfatases inducibles y nucleares, como son DUSP1/MKP-1, DUSP2/PAC-1, DUSP4/MKP-2 y DUSP5, con amplia selectividad de sustrato. El segundo grupo está formado por 3 fosfatases de localización citoplasmática y de expresión constitutiva DUSP6/MKP-3, DUSP7/MKP-X y DUSP9/MKP-4 y que además muestran selectividad por ERK1 y ERK2. El último grupo comprende DUSP8, DUSP10/MKP-5 y DUSP16/MKP-7, las cuales presentan selectividad de sustrato por las quinasas de estrés JNK y p38 y tienen localización subcelular mixta, tanto citoplasmática como nuclear (Figura 5, Tabla I).

**Tabla I. Nomenclatura, propiedades, fenotipo de ratones *knock out* de las fosfatasa de especificidad dual y posibles implicaciones en patologías en humanos.** Adaptada de (Dickinson y Keyse, 2006; Rios *et al.*, 2014).

Localización	Nombre	Otros nombres	Especificidad de sustrato	Fenotipo <i>Knock out</i>	Enfermedades en humanos
Nuclear	DUSP1 MKP-1	CL100, hVH1	ERK1/2, p38, JNK	Alteraciones inmunes y resistencia a la obesidad	Cáncer, depresión, obesidad, diabetes tipo 2, aterosclerosis
	DUSP4 MKP-2	hVH2	ERK1/2, p38, JNK	N/D	Cáncer, cardiomiopatía, sepsis inflamatoria, daño agudo del pulmón, y disminución de la respuesta inmune adquirida en ancianos
	DUSP2	PAC1	ERK1/2, p38	Resistencia a la inflamación	Cáncer, artritis
	DUSP5	hVH3	ERK1/2	N/D	Cáncer, autoinmunidad
Citoplasmática	DUSP6 MKP-3	PYST1	ERK1/2	Hipertrofia cardíaca	Cáncer, obesidad, diabetes tipo 2, esclerosis múltiple, daño por isquemia-reperfusión, disminución de la respuesta inmune adquirida en ancianos, trastorno bipolar
	DUSP7 MKP-X	PYST2	ERK1/2	N/D	Leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide aguda
	DUSP9 MKP-4	PYST3	ERK1/2 > p38	Insuficiencia placentaria, letal para la gestación	Obesidad, diabetes tipo 2
Mixta	DUSP8	hVH5	JNK, p38	N/D	Cáncer, abuso de drogas (¿?)
	DUSP10 MKP-5	N/A	JNK, p38	Alteraciones en la inmunidad innata y adaptativa	Cáncer, esclerosis múltiple, arteriosclerosis
	DUSP16 MKP-7	N/A	JNK, p38	N/D	

### 3.2. Regulación de las MKPs.

Las MKPs son proteínas reguladoras de la actividad de las MAP quinasas, que desempeñan funciones celulares de gran importancia, motivo por el cual estas fosfatasa también se encuentran sometidas a una estricta modulación de su actividad. Muchas MKPs son genes inducibles o de respuesta temprana y presentan unos bajos niveles de expresión en células en reposo o no estresadas, mientras que su expresión se incrementa rápidamente tras un estímulo apropiado, como por ejemplo algunas citoquinas, factores de crecimiento o suero. No obstante, la cinética y magnitud de la respuesta individual de estas MKPs depende del tipo celular y el contexto en el que se produzca dicho estímulo (Brondello *et al.*, 1997; Dowd *et al.*, 1998; Keyse, 2000). Esta inducción suele ser dependiente de la activación de las MAPKs, proponiéndose como un mecanismo de retroalimentación negativa en el contexto de una señalización que reduzca la intensidad de la señal mitogénica.

La transcripción de las MKPs puede ser activada por elementos que se encuentran como sustratos finales en la cascada de señalización de las MAP quinasas, los anteriormente denominados MAPKAPK (MAP Kinase Activated Protein Kinase, o Proteínas Quinasas Activadas por MAP quinasas), como podría ser AP-1 (Proteína activadora 1) (Brondello *et al.*, 1997). Por ejemplo, el promotor de DUSP1/MKP-1 presenta sitios de unión para Sp1, Sp3, CREB (Elemento de Unión de Respuesta a AMPc), USF-1 (*Upstream Stimulatory Factor 1*), NF- $\kappa$ B (Factor Nuclear  $\kappa$ B) y glucocorticoides (Ryser *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010; Shipp *et al.*, 2010) que incrementan la expresión del gen. Por otro lado, DUSP6/MKP-3 puede ser inducida por Ets-1, una diana de ERK1,2, tras la estimulación con FGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos) (Ekerot *et al.*, 2008).

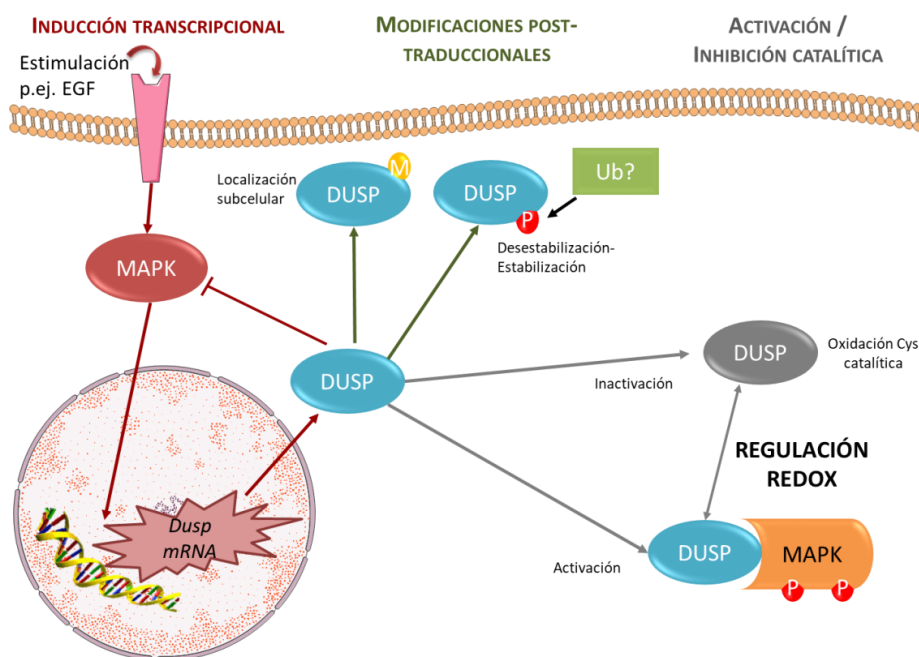
Las MKPs también pueden ser reguladas epigenéticamente por metilación o modificaciones de la cromatina (Li *et al.*, 2001; Waha *et al.*, 2010), como es el caso de la pérdida de expresión de *DUSP6* en cáncer de páncreas debido a la hipermetilación de su promotor (Xu *et al.*, 2005). La acetilación de histonas en respuesta a la estimulación del receptor TLR (*Toll like receptor*) (Chi y Flavell, 2008) incrementa la expresión génica de *dusp1*, actuando como mecanismo de retroalimentación negativa, al atenuar la activación de p38 y disminuir la respuesta innata inmune. Otro mecanismo epigenético de modificación es el silenciamiento génico a través de micro-ARNs. Se han identificado varios micro-ARNs que bloquean la expresión de DUSP1 y DUSP6 en diferentes modelos patológicos. Por ejemplo, las inyecciones intrahipocámpales de microRNA-125b disminuyen los niveles de expresión de *Dusp6* en un modelo de Alzheimer murino, o el microRNA-145-5p que silencia la expresión de *Dusp6* en un modelo murino de isquemia-reperfusión. Por otra parte, la transfección de macrófagos con microRNA-101 bloquea la inducción de la expresión de DUSP1/MKP-1 por LPS, mientras que el microRNA-200c disminuye la expresión de DUSP1/MKP-1 en la hipertrofia cardíaca asociada a diabetes inducida por estreptozocina y dieta alta en grasa en ratas. La puerarina, un compuesto derivado de la planta *Pueraria lobata* ha demostrado disminuir los niveles del microRNA-133a-3p, también responsable del silenciamiento de *dusp1* en un modelo de cáncer de mama y el microRNA-34a promueve la parada del ciclo celular, la apoptosis y la adhesión celular mediante el silenciamiento de DUSP1/MKP-1 en osteosarcoma (Banzhaf-Strathmann *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2017; Gang *et al.*, 2017).

Además de la inducción transcripcional, otros modos de regular la actividad catalítica de las MKPs implican la interacción directa con sus sustratos. La actividad catalítica de algunas MKPs, como DUSP1/MKP-1, DUSP4/MKP-2, DUSP6, DUSP7 y DUSP9/MKP-4, puede ser incrementada al unirse a sus sustratos a través del dominio KIM, promoviéndose un cambio estructural en el centro catalítico, que implica principalmente un cambio en la posición del aspártico auxiliar de la catálisis (Stewart *et al.*, 1999). Por otro lado, de igual manera que ocurre con otras PTPs, las MKPs son sensibles al estrés oxidativo. Las MKPs pueden sufrir modificaciones postraduccionales como la oxidación y consiguiente inactivación de la cisteína catalítica, ya que su oxidación reversible le arrebató su poder nucleofílico y promueve importantes cambios estructurales en el centro activo (Kamata *et al.*, 2005). Este fenómeno podría estar mediado por especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (Chiarugi y Cirri, 2003; Tonks, 2005).



En relación con los mecanismos de regulación postraduccionales, las MKPs también pueden ser reguladas por fosforilación directa mediada por sus propios sustratos, lo que puede llevar a una estabilización e incremento de la vida media de las MKPs o, por el contrario, llevarla a su degradación.

Se han identificado múltiples residuos que, tras ser fosforilados, marcan a las proteínas MKP para su degradación proteasomal. El ejemplo mejor conocido es DUSP1/MKP-1, que se puede fosforilar en la Ser323 y Ser329 del dominio catalítico por ERK1,2, permitiendo la interacción con una ubiquitina ligasa específica y resultando en la degradación de la proteína (Lin y Yang, 2006; Cagnol y Rivard, 2013). Por otro lado, la fosforilación en los residuos próximos al extremo carboxilo, Ser359 y Ser363, ejerce el efecto opuesto, incrementando la estabilidad de la proteína al resultar fosforilados por ERK1,2. El mismo mecanismo ocurre en los residuos correspondientes de DUSP4/MKP-2 (Brondello *et al.*, 1999; Cagnol y Rivard, 2013). Más alejado del dominio catalítico, las Ser174 y Ser197, en el extremo amino terminal de la proteína DUSP6/MKP-3 son también susceptibles de ser fosforiladas por ERK1,2, disminuyendo la vida media de la fosfatasa en este caso (Marchetti *et al.*, 2005; Jurek *et al.*, 2009). Además de las MAPKs, existen otras quinasas de gran importancia en la regulación de las DUSPs, como ocurre con la fosforilación de DUSP6/MKP-3 en el residuo Ser159, dependiente de mTOR, que promueve la degradación de la proteína (Bermudez *et al.*, 2008). Incluso la proteína Caseína Quinasa-2 $\alpha$  y la PKA (Proteína Quinasa A) pueden afectar, tanto a la actividad catalítica, como a la capacidad de unión y de reconocimiento de DUSP por las MAPKs. Además de la fosforilación, existen otros mecanismos de regulación, como la acetilación de DUSP1/MKP-1. Esta fosfatasa puede ser acetilada en respuesta a un estímulo inflamatorio y a la activación de la señalización ejercida por los receptores de tipo Toll-like. La modificación en el residuo Lys57 en el dominio KIM por p300 incrementa la interacción con la quinasa de estrés p38 y potencia la actividad catalítica de DUSP1/MKP-1 para frenar la señalización inflamatoria (Cao *et al.*, 2008). Todos estos mecanismos de regulación se representan gráficamente en la Figura 6.



**Figura 6. Representación esquemática de la regulación de los niveles de expresión y la actividad de las proteínas fosfatasas de especificidad dual.** Imagen adaptada de (Patterson *et al.*, 2009).

Finalmente, un novedoso mecanismo de regulación descrito para DUSP6/MKP-3 la relaciona con la señalización proapoptótica. DUSP6/MKP-3 presenta una región entre el dominio de unión a MAPK (KIM) y el dominio catalítico, que es susceptible de ser cortado por la proteína proapoptótica caspasa-3. En respuesta a estímulos apoptóticos, la caspasa-3 se activa y puede hidrolizar DUSP6/MKP-3 en este interdominio, generando fragmentos de la fosfatasa con diferentes actividades catalíticas que regulan la actividad y la localización subcelular de ERK (Cejudo-Marin *et al.*, 2012). Con todos estos datos, no se puede excluir la posibilidad de encontrar nuevos residuos y mecanismos aún no identificados que podrían ser relevantes en la regulación de la actividad y el recambio de los diferentes tipos de DUSP/MKPs.

### **3.3. Implicaciones fisiopatológicas de las MKPs.**

Mientras el conocimiento de las bases bioquímicas y estructurales de la especificidad de sustrato y catálisis de las MKPs ha ido incrementándose en los últimos años, el papel fisiológico de estas enzimas aún no ha sido completamente esclarecido. Esto se debe al gran número de MKPs con especificidades de sustrato solapantes combinado con el escaso número de modelos animales.

#### **3.3.1 Papel de las MKPs en la función inmunológica.**

Los miembros de la familia MAPK pueden ser activados por el receptor de TLR de la inmunidad innata para inducir la producción de citoquinas y mediadores inflamatorios. La intensidad relativa y la duración de la activación de diferentes MAP quinases pueden determinar el tipo de respuesta inmune. En este proceso juegan un papel importante las MKPs, que modulan su señalización, regulando el sistema inmunológico tanto innato como adaptativo (Lang *et al.*, 2006).

DUSP1/MKP-1, parece jugar un papel importante promoviendo la supervivencia celular y atenuando la señalización de estrés asociada las proteínas p38 y JNK (Zhao *et al.*, 2006). La pérdida de función de DUSP1/MKP-1 incrementa notablemente la fosforilación de p38 en macrófagos tratados con LPS, sugiriendo que esta fosfatasa podría regular la inflamación durante la respuesta inmune innata. Además, DUSP1/MKP-1 parece controlar los niveles de citoquinas proinflamatorias, como TNF (Factor de Necrosis Tumoral), y antiinflamatorias, como IL-10 (Interleuquina-10), en respuesta a lipopolisacárido. Asimismo, la ausencia de actividad DUSP1/MKP-1 va asociada a un incremento en la incidencia y severidad frente a la artritis autoinmune inducida experimentalmente (Chi *et al.*, 2006; Salojin *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006).

DUSP10/MKP-5 por su parte, regula la señalización de JNK y sirve como un importante regulador negativo de la respuesta inmune innata y de la función de las células T. Los animales deficientes en DUSP2/PAC-1 presentan un fenotipo complejo respecto a la regulación de la actividad de las MAPKs en células del sistema inmune, aunque parece ser que esta fosfatasa está relacionada con la inducción y mantenimiento de determinadas respuestas inflamatorias. Macrófagos carentes de DUSP2/PAC-1 son incapaces de sintetizar citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL12 $\alpha$ , COX-2 (Ciclooxigenasa-2) o IL1 $\beta$ , así como quimioquinas inflamatorias, tras un estímulo con LPS. Por lo tanto, a diferencia de DUSP1/MKP-1 y DUSP10, DUSP2/PAC-1 tendría un carácter proinflamatorio (Jeffrey *et al.*, 2006).

Por otro lado, ratones *knock out* para DUSP4/MKP-2 han mostrado una mayor sensibilidad a la infección por parásitos, asociada a una hiperfosforilación de p38 y JNK

en macrófagos y a una potenciación de la inducción de citoquinas proinflamatorias (Al-Mutairi *et al.*, 2010).

### 3.3.2 Papel de las MKPs en las respuestas de estrés y la homeostasis metabólica.

Es ampliamente conocido el papel de JNK y p38 en situaciones de estrés celular y, junto con ERK1,2, en el mantenimiento de la homeostasis metabólica. En los últimos años, diversos estudios se han centrado en su papel en enfermedades metabólicas sistémicas como la obesidad y la diabetes, donde las MKPs parecen tener un importante papel regulador de su actividad. Así, los ratones *knock out* de DUSP1/MKP-1 presentan una ganancia de peso más rápida tras el destete que los ratones “silvestres”, siendo resistentes a la obesidad inducida por una dieta alta en grasa y desarrollando esteatosis hepática, asociada a una hiperactividad de las MAPKs en tejidos sensibles a insulina (Dickinson y Keyse, 2006).

Por su parte, DUSP6/MKP-3 está sobreactivada en el hígado de ratones obesos e insulinoresistentes inducidos por dieta (ob/ob), antagonizando el efecto inhibitorio de la insulina sobre la gluconeogénesis. La disminución de la expresión de DUSP6/MKP-3 ralentiza la caída de los niveles de glucosa en sangre de los ratones obesos (Feng *et al.*, 2012; Jiao *et al.*, 2012).

### 3.3.3 Papel de las MKPs en el desarrollo.

Las MKP citoplásmicas específicas de ERK como DUSP6/MKP-3 y DUSP9/MKP-4 parecen jugar un papel muy importante en la embriogénesis y podrían estar implicadas en el desarrollo de determinados tejidos. Así, la delección de DUSP9/MKP-4 en ratones causa letalidad embrionaria en la mitad de la gestación, como consecuencia de una insuficiencia placentaria. Por otro lado, se han encontrado niveles elevados de expresión de DUSP9/MKP-4 durante el desarrollo del hígado, así como en los riñones y los testículos de ratones adultos (Christie *et al.*, 2005).

DUSP6/MKP-3 muestra patrones dinámicos de expresión de su ARN mensajero durante el desarrollo de las extremidades y del sistema nervioso central, así como en el desarrollo nasal, dental, piloso y de las glándulas mamarias en embriones murinos. La depleción de esta fosfatasa no presenta ninguna anomalía obvia en los embriones, sin embargo, se ha observado un incremento de la letalidad postnatal, dwarfismo esquelético (similar al enanismo), craneostosis (fusión temprana de las suturas craneales) y pérdida de audición (Li *et al.*, 2007). Todos estos patrones son consistentes con el incremento de actividad del receptor de FGF (Eblaghie *et al.*, 2003; Echevarria *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006). La depleción de la fosfatasa DUSP6 induce una hipertrofia cardíaca que podría proteger frente a lesiones por una sobrecarga o infarto de miocardio (Maillet *et al.*, 2008 pp. 31246 –31255).

### 3.3.4 Papel de las MKPs en cáncer.

De acuerdo con la función de las MKPs como reguladores negativos de la activación de las MAP quinasas inducida por mitógenos extracelulares, no es sorprendente que se encuentren alteradas en procesos tumorales. En este contexto la fosfatasa mejor caracterizada es DUSP6/MKP-3, que puede estar sobreexpresada en determinados tipos de cáncer, como se ha descrito en el carcinoma de células no-pequeñas de pulmón



(Sato *et al.*, 2006). Aunque en el cáncer de páncreas la expresión de *DUSP6* se encuentra reducida debido a la hipermetilación de su promotor, esta pérdida de expresión se asocia con la progresión de la neoplasia (Xu *et al.*, 2005). Además, la pérdida de *DUSP6*/*MKP-3* en cáncer de ovario incrementa la tumorigenicidad (Chan *et al.*, 2008).

Sin embargo, *DUSP1*/*MKP-1* muestra una expresión incrementada en el cáncer de páncreas, y que estaría de acuerdo con la disminución de la tumorigenicidad de las células pancreáticas cuando existe una menor actividad de la fosfatasa (Liao *et al.*, 2003). También se ha encontrado incrementada su expresión en líneas celulares de cáncer de próstata (Srikanth *et al.*, 1999) y gástrico (Bang *et al.*, 1998), pero disminuido en cáncer de ovario y testículos (Peng *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha visto que el nivel de actividad de las MKPs también puede afectar la respuesta a la quimioterapia. La expresión aumentada de *DUSP1*/*MKP-1* es capaz de sensibilizar las células cancerosas a la apoptosis inducida por el agente citotóxico cisplatino (Chattopadhyay *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Sanchez-Perez *et al.*, 2000). En cambio la sobreexpresión de *DUSP6*/*MKP-3* en cáncer de mama dependiente de estrógenos confiere resistencia a los efectos inhibidores del tamoxifeno (Cui *et al.*, 2006), mientras que la pérdida de *DUSP6*/*MKP-3* en cáncer de ovario incrementa la quimiorresistencia (Chan *et al.*, 2008).

Por tanto, es difícil hacer una predicción o pronóstico del papel que juegan verdaderamente las MKPs en las células tumorales, puesto que las MKPs pueden mostrar un incremento o descenso de su expresión o actividad en función del estadio del tumor, origen, etc (Loda *et al.*, 1996).

### 3.3.5 Papel de las MKPs en Sistema Nervioso.

Teniendo en cuenta las importantes funciones que las MAP quinasas desempeñan en el sistema nervioso, es necesario un fino control de su actividad por parte de las MKPs que regulan y contribuyen a modular procesos como la diferenciación, supervivencia celular, plasticidad sináptica, etc. De modo que no es sorprendente que sus niveles aparezcan alterados en muchos procesos patológicos y condiciones de estrés, dando lugar a una posible intervención terapéutica para reestablecer sus niveles normales de expresión y de actividad.

#### - Diferenciación neuronal.

La función de las fosfatasas de especificidad dual es menos conocido a nivel del sistema nervioso, siendo las fosfatasas *DUSP1*/*MKP-1* y *DUSP6*/*MKP-3* de las que existen más estudios y más evidencias en las distintas poblaciones neuronales y gliales. En concreto, los niveles de expresión de *DUSP1*/*MKP-1* y *DUSP6*/*MKP-3* varían y aumentan durante las distintas etapas de diferenciación neuronal en respuesta a factores de crecimiento y neurotrofinas, como el NGF.

Es necesario un balance adecuado entre los mecanismos de activación y desactivación de las MAPKs para el refinamiento de los procesos de diferenciación y proliferación de las distintas poblaciones neuronales, asegurando un correcto crecimiento axonal y un adecuado nivel de arborización dendrítica. Para esta función son esenciales las neurotrofinas, que activan las cascadas de las MAPKs, regulando, a su vez, a las proteínas fosfatasas. Como es el caso de la neurotrofina BDNF (Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro), implicada en la inducción transcripcional y en la estabilización de

la fosfatasa DUSP1/MKP-1 de manera dependiente de ERK1,2. Esta DUSP1/MKP-1 ejerce su efecto sobre JNK que, a su vez, regula las dinámicas del citoesqueleto, promoviendo la arborización dendrítica y ramificación axonal (Jeanneteau *et al.*, 2010; Jeanneteau y Deinhardt, 2011).

- Neuroprotección.

El mantenimiento de unos niveles de expresión adecuados de las fosfatasas DUSP1/MKP-1 y DUSP6/MKP-3 también es importante para la supervivencia celular. Determinados estímulos tóxicos o de estrés celular, promueven una sobreactivación de las MAP quinasas asociadas al estrés, p38 y JNK, que resultan proapoptóticas en neuronas y proinflamatorias en microglia. Además, la activación de ERK, puede resultar tanto neuroprotectora como deletérea, en función del tiempo, el nivel de activación y el compartimento celular donde se produzca. Este aumento de las MAPKs puede ser consecuencia, en muchos casos, de que las MKPs se encuentren desreguladas en condiciones patológicas, pudiendo ser inactivadas por oxidación cuando tienen lugar fenómenos de estrés oxidativo (Luo y DeFranco, 2006; Levinthal y DeFranco, 2005). En diversas ocasiones su expresión a nivel de ARNm se encuentra reducida, por efecto de agentes tóxicos que dañan el ADN, como la luz ultravioleta o fármacos citotóxicos usados en quimioterapia (Gozdz *et al.*, 2003; Gozdz *et al.*, 2008).

Son numerosos los estudios que demuestran que la sobreexpresión de las fosfatasas DUSP1/MKP-1 y DUSP6/MKP-3 en distintos modelos neuronales y gliales, pueden evitar la muerte celular frente a la exposición a estímulos citotóxicos, como altas concentraciones de glutamato extracelular (Stanciu *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2006), estrés oxidativo inducido por la adición de agua oxigenada (Luo y DeFranco, 2006; Xu *et al.*, 2004), o estrés genotóxico producido por la exposición a luz ultravioleta o cisplatino (Gozdz *et al.*, 2003; Gozdz *et al.*, 2008; Franklin *et al.*, 1998; Staples *et al.*, 2010). Esto frenaría la señalización apoptótica derivada de una excesiva activación de las quinasas p38 y JNK. Por ejemplo, en estudios *in vivo* realizados en modelos de hipoxia e isquemia cerebral, el restablecimiento de la expresión de DUSP1/MKP-1 resulta esencial para mantener la supervivencia neuronal en la región afectada por el infarto y mejora el pronóstico de la lesión (Dreixler *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Koga *et al.*, 2012).

Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el efecto final de un aumento de la actividad de las fosfatasas MKP puede depender del tipo celular, de la severidad del daño, o de si el estímulo se encuentra en la fase temprana o avanzada. La inhibición de la expresión de DUSP6/MKP-3 en oligodendrocitos de rata disminuye la muerte celular producida por la sobreactivación de los receptores de glutamato, tipo AMPA (Ácido- $\alpha$ -Amino-3-hidroxi-5-Metilisazol-4-Propiónico), ya que mantiene unos niveles adecuados de actividad ERK1,2 favoreciendo un efecto promotor de la supervivencia (Domercq *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que la inhibición de DUSP6/MKP-3 podría ser una importante diana en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

De acuerdo con el papel antiinflamatorio de DUSP1/MKP-1, su sobreexpresión parece suprimir la inflamación sistémica, siendo una potencial diana terapéutica a nivel de sistema nervioso central. DUSP1/MKP-1 está altamente expresada en células microgliales, los macrófagos endógenos del cerebro, de hecho DUSP1/MKP-1 juega un importante papel protegiendo a las neuronas durante procesos inflamatorios en el sistema nervioso (Eljaschewitsch *et al.* 2006). Se sabe que la expresión de DUSP1/MKP-1 y también de DUSP6/MKP-3 en poblaciones celulares de la médula

espinal, es crucial para la resolución del dolor y de la inflamación en modelos de dolor neuropático, como resultado de la inhibición de la actividad de p38 (Ndong *et al.*, 2012).

- Enfermedades del sistema nervioso.

La expresión de estas fosfatasa MKP se encuentra asimismo desregulada en procesos neurodegenerativos y en enfermedades neurológicas (Collins *et al.*, 2015). La señalización aberrante de las MAP quinasas representa una característica central de las rutas de muerte celular, y la fosforilación excesiva o deficiente de determinados sustratos directos e indirectos de las MAPKs, están detrás de la formación de los agregados proteicos tóxicos que caracterizan muchos procesos neurodegenerativos (Bhore *et al.*, 2017).

Un desequilibrio entre la actividad de ERK1,2 y la expresión de DUSP1/MKP-1 y DUSP6/MKP-3 parece ser clara en enfermedades neurodegenerativas (Colucci-D'Amato *et al.*, 2003). En muestras *post mortem* de corteza cerebral de pacientes de Alzheimer se han identificado menores niveles de DUSP1/MKP-1 y DUSP6/MKP-3 (Jeanneteau y Chao, 2013; Banzhaf-Strathmann *et al.*, 2014). La disminución de los transcritos de DUSP6/MKP-3 se correlaciona con una sobreexpresión del microRNA miR-125b, indicando que DUSP6/MKP-3 es una diana directa de miR-125b. La sobreexpresión de este microRNA en neuronas hipocampales es suficiente para mimetizar algunos de los signos cardinales del Alzheimer, como el depósito del péptido  $\beta$ -amiloide y la hiperfosforilación de Tau (Banzhaf-Strathmann *et al.*, 2014). La actividad de la fosfatasa DUSP1/MKP-1 también se encuentra reducida en la enfermedad de Alzheimer, y está asociada a un déficit en la señalización mediada por BDNF que representa un factor de riesgo para la enfermedad. La pérdida de la actividad de DUSP1/MKP-1 podrían explicar la hiperfosforilación de Tau y el declive cognitivo que acompaña a esta enfermedad, viéndose revertidos al incrementar la expresión del gen DUSP1/MKP-1 en la corteza cerebral (Jeanneteau y Chao, 2013; Arango-Lievano *et al.*, 2016).

Una situación similar de deficiencia en los niveles de expresión de DUSP1/MKP-1 se ha descrito en modelos murinos de la enfermedad de Huntington y en muestras *postmortem* de pacientes humanos que padecen la enfermedad (Luthi-Carter, 2003).

En el contexto de los trastornos neurológicos se manifiesta la pauta contraria, se ha observado una mayor expresión de las proteínas MKPs, especialmente DUSP1/MKP-1 y DUSP6/MKP-3. Estudios de asociación genética han relacionado el trastorno bipolar con variantes genéticas y polimorfismos de DUSP6/MKP-3 que implican una ganancia de función. El aumento de la actividad de DUSP6/MKP-3 se correlaciona con un descenso de la señalización de ERK1,2 en respuesta al tratamiento con litio, y puede afectar a la eficacia terapéutica del tratamiento convencional del trastorno bipolar (Kalkman, 2012; Kim *et al.*, 2012).

Finalmente, la expresión de DUSP1/MKP-1 se encuentra elevada en el cerebro de un modelo de rata de trastorno depresivo (Duric *et al.*, 2010). Los niveles de *Dusp1* se encuentran significativamente incrementados en el giro dentado y en la región CA3 de estas ratas, disminuyendo con el tratamiento con fluoxetina (Duric *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015).

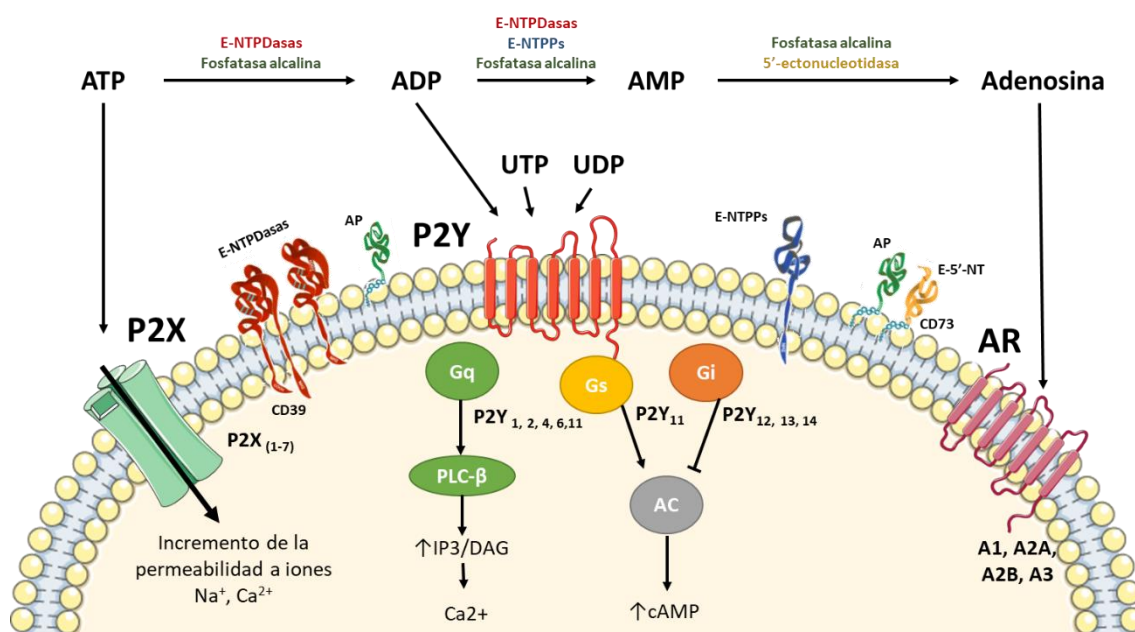
## Señalización purinérgica.

El ATP (Adenosina 5'-Trifosfato) y los nucleótidos son moléculas fundamentales en la función celular. Participan en innumerables procesos, en el metabolismo celular, en la regulación enzimática, en el mantenimiento de los gradientes iónicos de membrana, en el trabajo mecánico del movimiento celular y como integrante estructural de los ácidos nucleicos, siendo así indispensable para la vida. En las últimas décadas se ha demostrado que los nucleótidos también se liberan al medio extracelular de manera controlada, actúan como mensajeros extracelulares, poseen receptores de membrana específicos y regulan multitud de funciones en el organismo. Los primeros estudios sobre la importancia del ATP como mensajero extracelular comenzaron en 1929, cuando Drury y Szent-Györgyi describieron por primera vez la potente acción del ATP y de la adenosina en los vasos sanguíneos y el corazón. En 1959, Pamela Holton presentó el primer indicio del papel neurotransmisor del ATP, demostrando que se producía durante la estimulación antidrómica de los nervios sensoriales (Holton, 1959). La búsqueda de un transmisor no adrenérgico ni colinérgico en las terminaciones nerviosas que inervan la musculatura lisa del intestino y la vejiga urinaria llevó al hallazgo a finales de la década de 1960 por parte de Burnstock G y cols., del ATP o un nucleótido relacionado como los compuestos responsables de esta neurotransmisión (Burnstock *et al.*, 1970; Burnstock, 1972). Esta hipótesis "purinérgica" no gozó de mucho éxito, en parte quizá por considerar al ATP como una molécula con funciones mayoritariamente intracelulares y como fuente de energía. Además, una molécula tan ubicua no parecía poder postularse como un neurotransmisor.

Sin embargo, el esfuerzo y el ahínco de numerosos grupos de investigación, ha permitido la caracterización de todas las etapas de la señalización extracelular mediada por nucleótidos denominada señalización purinérgica: el almacenamiento y liberación al medio extracelular, los receptores, la terminación de sus acciones extracelulares, y la recuperación de los niveles intracelulares de nucleótidos. La neurotransmisión purinérgica ha resultado ser mucho más compleja que la del resto de neurotransmisores. El ATP, y los dinucleótidos se almacenan en vesículas secretoras o en vesículas sinápticas, con las aminas biógenas, acetilcolina, catecolaminas, serotonina, histamina, etc y se liberan al medio extracelular por un mecanismo exocitótico. Una vez en el medio extracelular los nucleótidos interaccionan con receptores específicos (receptores P2), localizados en las células adyacentes e incluso en las células que los liberan. Como sucede en la neurotransmisión colinérgica, los nucleótidos no se internalizan, sino que se degradan en el medio extracelular por las enzimas denominadas ectonucleotidasas, si bien en este caso, se generan compuestos que siguen siendo activos, como ADP (Adenosina 5'-Difosfato), y pueden interaccionar con otros receptores (Figura 7).

Las ectonucleotidasas degradan rápidamente el ATP liberado al medio extracelular, eliminando los fosfatos y generando el nucleósido adenosina como producto final. Son una familia de enzimas, consisten en las NTPDasas 1, 2, 3 y 8 (Nucleótido Trifosfato difosfohidrolasas 1, 2, 3 y 8), NPP 1, 2 y 3 (Nucleótido Pirofosfatasa, 1, 2 y 3), la fosfatasa alcalina, y la CD73 ó 5'-NT (5'-Nucleotidasa) (Zimmermann, 2001). Todas ellas se expresan en el cerebro y difieren en la especificidad de sustrato, propiedades cinéticas y reguladoras. Así las NTPDasas y las NPPs hidrolizan ATP y ADP para producir AMP (Adenosina 5'-Monofosfato), que es hidrolizado a adenosina por la 5'-Nucleotidasa. La fosfatasa alcalina hidroliza nucleósidos tri-, di- y monofosfato. Los dinucleósidos polifosfato (ApnA), NAD<sup>+</sup> (Nicotinamida adenina dinucleótido) y los

azúcares activados con UDP (Uridina 5'-Difosfato) son sustratos exclusivos de las NPPs. Estas ectonucleotidasas se representan en la Figura 7.



**Figura 7: Esquema-resumen de la señalización purinérgica.** En el esquema se muestran los distintos tipos de receptores que conforman el sistema purinérgico: los receptores de nucleótidos de tipo ionotrópico P2X, cuyo principal agonista fisiológico es el ATP, y los receptores de tipo metabotrópico, que comprenden a los receptores P2Y y AR, los cuales tienen como principales ligandos endógenos nucleótidos tri- o difosfato y la adenosina, respectivamente. Las ectonucleotidasas son las encargadas de degradar el ATP hasta adenosina, generando los sustratos necesarios para poder activarse todo el sistema purinérgico. Las ectonucleotidasas tienen su centro activo orientado hacia el espacio extracelular. Las líneas azules representan las regiones conservadas de los dominios apirasa. Las NTPDasas (Nucleótido Trifosfato Difosfohidrolasas) y las NPPs (Nucleótido Pirofosfatasa) son proteínas integrales de membrana, mientras que la fosfatasa alcalina y la 5'-NT (5'-Nucleotidasa) son proteínas ancladas a GPI (Glicosilfosfatidilinositol). Ectonucleotidasas adaptadas de (Bonan, 2010).

La adenosina también posee receptores específicos (receptores P1 ó AR). Por tanto, la señalización purinérgica finaliza tras la retirada de la adenosina del medio extracelular (internalización), proceso llevado a cabo por los transportadores de nucleósidos. La adenosina es fosforilada en 5'-AMP por la acción de la enzima adenosina quinasa y, a continuación, a ADP y ATP, recuperando así el reservorio intracelular de nucleótidos (Latini y Pedata, 2001; Zimmermann, 2000). La adenosina puede ser también metabolizada a inosina e hipoxantina mediante la adenosina deaminasa y a ácido úrico por la xantina oxidasa. Finalmente, los nucleótidos intracelulares serán de nuevo incorporados a las vesículas sinápticas por VNUT, el transportador vesicular de nucleótidos dependiente de Cl<sup>-</sup>, que pertenece a la familia de transportadores de aniones SLC17. VNUT reconoce preferentemente ATP, GTP y ADP y es inhibido por dinucleósidos polifosfato (Miyaji *et al.*, 2011). Este transportador se encuentra ampliamente expresado en el cerebro, así como en las células cromafines de la médula adrenal. El transportador VNUT colocaliza con otros transportadores de neurotransmisores como VGLUT (Transportador Vesicular de Glutamato) o VGAT (Transportador Vesicular de GABA) (Larsson *et al.*, 2012). En algunas terminaciones neuronales de la habénula media y de la corteza, podría haber reservorios de vesículas exclusivas de ATP (Pankratov *et al.*, 2006; 2007).



Los transportadores de nucleósidos pueden ser de tipo equilibrativo (ENT, SLC29), que está presente en la mayoría de los tejidos, y de tipo concentrativo (CNTs, SCL28), principalmente localizado en los epitelios de absorción y en células del sistema inmune (Paes-De-Carvalho, 2002). En determinadas condiciones, casi siempre relacionadas con estrés celular, se puede liberar adenosina por la reversión de los transportadores equilibrativos, incluso en células del sistema nervioso. Los transportadores de nucleósidos, sobre todo los de tipo concentrativo, se han propuesto como marcadores tumorales (Pastor-Anglada y Perez-Torras, 2015).

Recientemente se ha demostrado que los nucleótidos también se pueden liberar al espacio extracelular por mecanismos no exocitóticos, a través de los transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*), hemicanales de panexina o conexinas, canales dependientes de voltaje, e incluso a través de un receptor de ATP ionotrópico, el receptor P2X7, como se describirá más adelante (Burnstock, 2006b; De Vuyst *et al.*, 2006).

## 1. Receptores purinérgicos.

Los receptores purinérgicos se pueden clasificar en dos grandes grupos: los receptores P1 y P2 (para adenosina y ATP, respectivamente). Dentro de los receptores P2 existen dos subtipos: los receptores metabotrópicos o P2Y, acoplados a proteínas G, y los receptores ionotrópicos o P2X.

Los receptores de adenosina (AR, previamente denominados P1) se han clasificado en 4 subtipos, receptores A1, A2A, A2B y A3, todos ellos de naturaleza metabotrópica, y pertenecen a la superfamilia de los GPCRs. Los receptores A1 y A2A poseen una alta afinidad por la adenosina (en el rango nM), mientras que A2B y A3 muestran relativamente una menor afinidad (μM). Tradicionalmente se han clasificado en función de su acoplamiento a la adenilato ciclasa. Los receptores A1 y A3 están acoplados a proteínas de tipo Gi/o y a la inhibición de la adenilato ciclasa, mientras que los A2A y A2B están acopladas a proteínas Gs y a la activación de este enzima (Fredholm *et al.*, 2011). La activación de los receptores A2A y A2B, por tanto, incrementa los niveles de AMPc (AMP cíclico), promoviendo la activación de PKA y la consiguiente fosforilación del factor de transcripción CREB (Paes-De-Carvalho, 2002).

En el sistema nervioso la adenosina modula la liberación de neurotransmisores (Sebastiao y Ribeiro, 2000; Fredholm *et al.*, 2011; Cunha y Ribeiro, 2000; Rebola *et al.*, 2002), la plasticidad sináptica (Costenla *et al.*, 2001) y ejerce acciones neuroprotectoras en procesos de isquemia, hipoxia y estrés oxidativo (Cunha, 2001; Berk *et al.*, 2001). El receptor A2A es una importante diana farmacológica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson debido a su interacción con el sistema dopaminérgico en las áreas extrapiramidales. El bloqueo de la actividad de estos receptores reduce los efectos de la depleción postsináptica de dopamina, aliviando los síntomas motores y disminuyendo la neurodegeneración en esta patología (Morelli *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 2016).

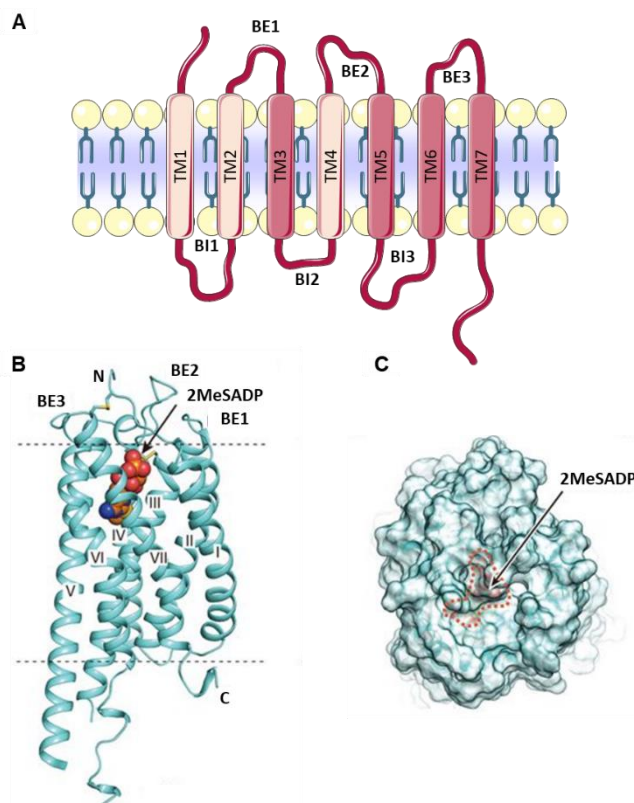
A nivel periférico la adenosina ejerce un potente efecto vasodilatador en el sistema cardiovascular, y regula la respuesta inmune y la inflamación (Hasko y Pacher, 2008; Borea *et al.*, 2016).

### 1.1. Receptores metabotrópicos P2Y.

Los receptores P2Y como receptores metabotrópicos también pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Burnstock y Kennedy, 1985). Hasta la fecha se han identificado 8 subtipos de receptores P2Y en humanos (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>), que pueden ser activados por nucleótidos de adenina y uridina (ATP y UTP) e incluso por los nucleótidos difosfato (ADP y UDP) (Abbracchio *et al.*, 2006).

La estructura primaria y secundaria de los receptores P2Y evidencian la presencia de un extremo N-terminal extracelular seguido de 7 dominios transmembrana que delinean 3 bucles extracelulares (BEs) (Bessette *et al.*, 2008) y otros 3 intracelulares (BIs), con un extremo C-terminal intracelular con una longitud variable en función del subtipo de receptor (Abbracchio *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2005) (Figura 8). La reciente publicación de la estructura cristalizada de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> confirma patrones típicos de los GPCRs (Zhang *et al.*, 2014). Todos los receptores P2Y poseen en sus dominios extracelulares 4 residuos de cisteína, los cuales intervienen en la formación de dos puentes disulfuro para P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>12</sub>: el primero entre el dominio N-terminal y BE3, y el segundo entre BE1 y BE2 (Hoffmann *et al.*, 1999; Algaier *et al.*, 2008; Hillmann *et al.*, 2009). El papel del puente disulfuro entre BE1 y BE2 parece ser importante para la unión de los ciertos ligandos, como los antagonistas no competitivos del receptor P2Y<sub>12</sub>, Clopidogrel y Prasugrel, ampliamente usados en clínica como antritrombóticos (Savi *et al.*, 2006; Algaier *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009).

Los P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub> están acoplados a proteínas Gq y a la activación de la fosfolipasa C, la cual promueve la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5- bifosfato de la membrana plasmática, generando dos segundos mensajeros: inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol, que inducen la liberación de calcio de reservorios intracelulares y la activación de la PKC (Proteína Quinasa C), respectivamente (Abbracchio *et al.*, 2006; Erb *et al.*, 2006). Por otro lado, la subfamilia formada por los receptores más recientemente clonados, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>, se caracteriza por su acoplamiento a proteínas Gi/o, ya que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa y la producción de AMPc (Abbracchio *et al.*, 2006; Erb *et al.*, 2006). Únicamente el receptor P2Y<sub>11</sub> está acoplado de manera positiva a la activación de la adenilato ciclasa y es el único que reconoce selectivamente al ATP. Se podría hacer otra clasificación, en función del tipo de ligando que reconocen. Mientras que los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub> son los receptores selectivos para ADP, los receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub> pueden reconocer nucleótidos de adenina y uridina, en su forma di- y trifosfato (UDP, UTP). Por último, el receptor P2Y<sub>14</sub> responde a azúcares activados como UDP-glucosa (Tabla II). Los receptores P2Y activan múltiples cascadas de señalización dependiendo del tipo y contexto celular, como es la activación de la vía PI3K/Akt, y la activación de las MAP quinasas regulando multitud de funciones (Abbracchio *et al.*, 2006; Weisman *et al.*, 2012). Están ampliamente distribuidos por todos los tejidos, siendo especialmente abundantes en el sistema nervioso, donde modulan una gran variedad de procesos fisiológicos que dejan advertir su posible potencial terapéutico (Tabla II).



**Figura 8. Estructura de los receptores P2Y.** (A) Esquema de la estructura de un receptor P2Y. TM, Dominio transmembrana; BE, Bucle Extracelular; BI, Bucle intracelular. Los dominios transmembrana 3, 5, 6 y 7 se encuentran sombreados ya que son los que contienen los residuos implicados en la unión del ligando. (B) Vista lateral de la estructura del complejo del receptor P2Y<sub>12</sub> con el agonista sintético 2MeSADP (2-Metil-tio-Adenosina-5'-Difosfato). El receptor está coloreado en azul. El ligando se muestra en representación de esferas con los carbonos en naranja. Los puentes disulfuro se muestran en amarillo. (C) Representación semi-transparente del receptor en vista superior. Se muestra la tapa formada por BE2, BE3 y el extremo N-terminal sobre el 2MeSADP (Zhang *et al.*, 2014).

Los receptores P2Y, como la mayoría de los GPCRs se desensibilizan por una exposición prolongada al agonista. Esto ocurre por la fosforilación intracelular de determinados residuos, promoviendo así la unión de las  $\beta$ -arrestinas y la consiguiente internalización y degradación del receptor (Shenoy, 2011).

Numerosos estudios utilizando diferentes aproximaciones experimentales han demostrado que los receptores P2Y pueden formar homo o heterodímeros, si bien no se conocen sus implicaciones fisiopatológicas. La activación de los receptores P2Y<sub>1</sub> induce una homodimerización seguida de la internalización de este receptor (Choi *et al.*, 2008). Los receptores P2Y<sub>1</sub> también pueden formar heterómeros con los receptores P2Y<sub>11</sub> (Ecke *et al.*, 2008), e incluso forman heteroligómeros funcionales con el receptor A1 de adenosina *in vitro* (Yoshioka *et al.*, 2002). Este heterodímero P2Y<sub>1</sub>/A1 se ha localizado en corteza de rata, hipocampo y cerebelo (Tonazzini *et al.*, 2008; D'Alimonte *et al.*, 2007). También existe evidencia de la homodimerización de receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub> (Suzuki *et al.*, 2006; D'Ambrosi *et al.*, 2007; Ecke *et al.*, 2008).



**Tabla II. Características farmacológicas y funcionales de los receptores P2Y.** Se indican los agonistas y antagonistas de los receptores metabotrópicos P2Y, más utilizados para la caracterización de cada uno de los receptores, así como el potencial terapéutico indicativo de sus funciones fisiológicas.

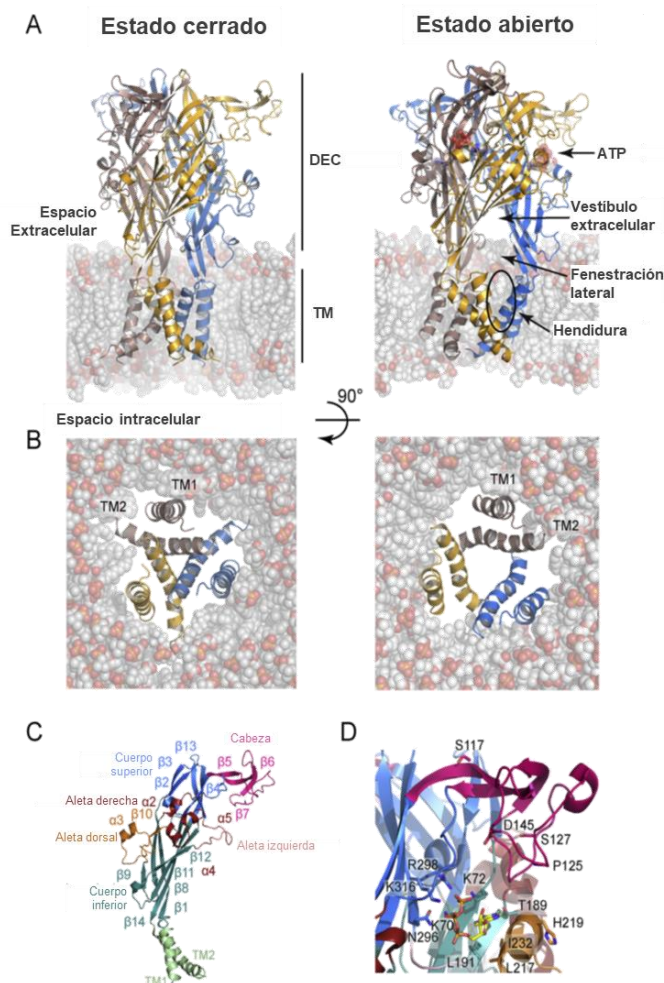
Receptor	Agonistas	Antagonistas	Potencial terapéutico
P2Y <sub>1</sub>	Endógeno: ADP Sintético: 2MeSADP, MRS 2365	PPADS, suramin, MRS2179, MRS2500	Los antagonistas P2Y <sub>1</sub> pueden prevenir el daño inducido por citoquinas y quimioquinas en ratones y pueden reducir los comportamientos de ansiedad en ratas. Los agonistas inducen la elongación axonal en neuronas y la modulación de la percepción del dolor
P2Y <sub>2</sub>	Endógeno: ATP/ UTP Sintético: UTPyS, Ap <sub>4</sub> A, Up <sub>4</sub> U, INS365 (Diquafosol)	PPADS, Suramin, Reactive blue 2	Los agonistas P2Y <sub>2</sub> pueden incrementar la migración y la proliferación de células gliales, el procesamiento no amiloidogénico del APP en neuronas, y la captación y degradación de las formas neurotóxicas de A $\beta$ 1-42 en las células microgliales
P2Y <sub>4</sub>	Endógeno: UTP Sintético: UTPyS	PPADS, Reactive blue 2	La activación del receptor P2Y <sub>4</sub> puede inhibir la liberación presináptica de glutamato, modular la función de la barrera hematoencefálica, e inhibir las corrientes de K <sup>+</sup> en miocitos de rata
P2Y <sub>6</sub>	Endógeno: UDP Sintético: UDPyS	PPADS, Suramin, Reactive blue 2, MRS2567, MRS2578, MRS2575	La activación del receptor P2Y <sub>6</sub> incrementa la actividad fagocítica de la microglía y regula los mecanismos de reparación en el sistema nervioso central
P2Y <sub>11</sub>	Endógeno: ATP Sintético: ATPyS	Suramin, Reactive blue 2, AMP $\alpha$ S, NF157, NF340	La activación del receptor P2Y <sub>11</sub> retrasa la apoptosis inducida por patógenos e inflamación en neutrófilos, inhibe la señalización por TLR y modula la liberación de citoquinas
P2Y <sub>12</sub>	Endógeno: ADP Sintético: 2MeSADP	Clopidogrel Ticlopidine Prasugrel Ticagrelor Elinogrel, Cangrelor	Los antagonistas del receptor P2Y <sub>12</sub> se han empleado ampliamente en clínica como antiagregantes plaquetarios. La activación de este receptor puede regular la migración de las células gliales e incrementar la proliferación celular
P2Y <sub>13</sub>	Endógeno: ADP Sintético: 2MeSADP	MRS2211, PPADS, Suramin	La activación del receptor P2Y <sub>13</sub> incrementa el transporte de glicina en el espacio sináptico y promueve la supervivencia neuronal a través de la vía PI3K/Akt
P2Y <sub>14</sub>	Endógeno: UDP-glucosa Sintético: MRS2690		La activación del receptor P2Y <sub>14</sub> puede modular las respuestas inflamatorias a través de la producción quimioquinas y citoquinas y podría estar implicado en la contracción muscular

## 1.2. Receptores ionotrópicos P2X.

Se trata de receptores de tipo canal iónico activado por ligando, que se activan por la presencia de ATP extracelular (Burnstock, 2006a; North, 2002). Existen 7 genes para las subunidades de receptores P2X y cada una de estas subunidades consta de una longitud que varía desde los 384 (P2X4) hasta los 595 aminoácidos (P2X7). Cada subunidad consta de dos regiones hidrofóbicas que actúan como dominios transmembrana TM1 y TM2, y que presentan conformación de  $\alpha$ -hélice (Brake *et al.*, 1994; North, 1996), teniendo TM1 una localización más periférica en el receptor, y contribuyendo escasamente a la permeabilidad de iones a través de la membrana. Estas regiones hidrofóbicas están conectadas por una región polipeptídica de gran longitud (ectodominio) que se sitúa en el espacio extracelular y en la que se encuentran los sitios de unión para el ATP, quedando tanto el extremo amino como el carboxilo terminal en la región intracelular. Estos receptores no presentan homología de secuencia con otros canales iónicos conocidos. La región del C-terminal difiere considerablemente en su secuencia entre las distintas subunidades, mientras que la región que incluye los dos segmentos transmembrana y el dominio extracelular supone la región más conservada entre las distintas subunidades de P2X, presentando entre un 40 y un 55% de identidad. Una característica llamativa de esta identidad es la conservación de 10 cisteínas en el bucle extracelular. Todas las subunidades de los receptores P2X contienen secuencias consenso de N-glicosilación (Asn-X-SerThr) cuyas posiciones se encuentran bastante conservadas entre las distintas especies, pero existe poca homología entre los distintos receptores, tanto en número como en localización (North, 2002).

Los receptores funcionales son trímeros, pudiendo ser homo o heterotrímeros dependiendo de las subunidades que lo formen. Las estructuras cristalizadas de una forma truncada del receptor P2X4 de pez cebra obtenida en ausencia (Kawate *et al.*, 2009), y en presencia del ATP (Hattori y Gouaux, 2012) revelaron la organización tridimensional de los receptores de forma precisa, así como el plegamiento de cada subunidad (Figura 9). La forma general de las subunidades podría asemejarse a la de un delfín, consistiendo esta forma en un cuerpo, una cabeza, una cola y las aletas dorsales, izquierda y derecha. Esta comparación permite una diferenciación clara de las distintas regiones estructurales. El largo ectodominio glicosilado representa el cuerpo del delfín, y está conformado por residuos altamente conservados, organizados como en una lámina- $\beta$  rígida y estabilizada por 5 puentes disulfuro. Ramificándose hacia el exterior de la parte central del cuerpo encontramos la cabeza y las aletas dorsal, izquierda y derecha. Los dominios transmembrana, unidos a la cola del delfín, están organizados como  $\alpha$ -hélices. TM1 está localizado más periféricamente que TM2, siendo este segundo el responsable de la conducción de los iones al asociarse las tres hélices TM2 del trímero, formando un ángulo de 45° respecto al plano que describe la membrana. Existen dos rutas potenciales a través de las cuales los iones pueden atravesar la membrana: una ruta central, donde los iones entrarían verticalmente al canal a través de los 3 canales posicionados a lo largo del eje central del canal del receptor, o alternativamente, una ruta lateral, donde los iones atravesarían el canal a través de tres fenestraciones localizadas alrededor de la región de entrada. Aunque la hipótesis más probable, por ser la energéticamente más favorable, es la hipótesis de la ruta lateral (Kawate *et al.*, 2011; Samways *et al.*, 2011). Existen 8 residuos altamente conservados para la unión del ATP a estos receptores (Lys70, Lys72, Asn96, Phe188, Thr189, Phe297, Arg298, y Lys316). Estos residuos forman un estrecho grupo,

localizado en una cavidad que se forma entre subunidades y albergada entre la cabeza y la aleta izquierda de las subunidades del receptor.



**Figura 9. Organización estructural de los receptores P2X.** (A) Vista lateral de la estructura cristalizada del receptor Dzfp2X4 en estado cerrado (izquierda) y en estado abierto, unido a ATP (derecha). DEC indica los dominios extracelulares y TM, dominios transmembrana. (B) Las mismas estructuras que en (A), vistas desde arriba del lado extracelular, a lo largo del eje del canal central. (C) Representación esquemática de cada subunidad. Cada dominio es nombrado de acuerdo a una comparación con las distintas partes del delfín. El dominio extracelular se compone de 14 láminas-β y 4 α-hélices, mientras que 2 α-hélices forman el dominio transmembrana. (D) Vista de cerca del sitio de unión a ATP coloreada con el mismo código de color que en la imagen. Se numeran algunos de los residuos indicados en el texto (Habermacher *et al.*, 2016).

En respuesta a la unión de ATP se produce un cambio conformacional en estos receptores, pasando de un estado cerrado a un estado abierto (denominado I1), permitiendo el flujo de iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana (Egan y Khakh, 2004), siendo el receptor P2X7 el más permeable a  $\text{Ca}^{2+}$ . La exposición prolongada a ATP permite la formación de un estado desensibilizado, una inactivación temporal que frena el flujo de iones mientras el ATP esté unido al receptor. Las cinéticas de desensibilización varían en función del tipo de receptor P2X, siendo la más rápida la de los receptores P2X1 y P2X3, y la más lenta en P2X2, P2X4 y P2X5, destacando el receptor P2X7 al ser resistente a este tipo de desensibilización (North, 2002). La disociación del ATP del estado desensibilizado, permite al receptor retornar al estado inicial cerrado, pudiendo ser abierto de nuevo. Este proceso se conoce como resensibilización. Existe otro estado de conducción de estos receptores (I2) en algunos tipos de P2X, donde se produce una dilatación del poro, siendo el canal progresivamente más permeable a cationes de mayor tamaño e incluso a determinadas moléculas como ciertos tintes, (Khakh *et al.*, 1999; Virginio *et al.*, 1999; Surprenant *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2005). Se cree que la activación del poro a través de P2X7 podría estar mediada por una compleja señalización que implica al citoesqueleto y a integrinas (Wilson *et al.*, 2002).

El reconocimiento de los distintos tipos de receptores P2X desde el punto de vista farmacológico es muy difícil, ya que se carece de ligandos selectivos para cada uno de ellos, siendo los más utilizados los que se detallan en la Tabla III.

**Tabla III. Características farmacológicas y funcionales de los receptores P2X.** Agonistas y antagonistas para los diferentes subtipos de receptores P2X y su posible potencial terapéutico (Burnstock, 2013).

Receptor	Agonistas	Antagonistas	Potencial Terapéutico
P2X1	BzATP > ATP (nM) = $\alpha,\beta$ -meATP = L- $\beta,\gamma$ -meATP (desensibilización rápida)	NF449 > IP5I > TNP-ATP	Niveles de receptor incrementados en corazones de ratas con fallo cardíaco congestivo. También se ha relacionado con la entrada del virus VIH en macrófagos
P2X2	ATP(nM) $\geq$ ATP $\gamma$ S $\geq$ 2MeSATP	PSB-1011 > RB2, isoPPADS > PPADS > Suramina	Se ha relacionado con enfermedades digestivas como el síndrome del colon irritable o la colitis ulcerosa
P2X3	2MeSATP $\geq$ ATP (nM) $\geq$ Ap <sub>4</sub> A $\geq$ $\alpha,\beta$ -meATP (desensibilización rápida)	TNP-ATP, isoPPADS > Rojo Fenol	Su activación por ATP promueve la liberación de insulina, pudiendo estar implicado en diabetes. Los antagonistas de este receptor han demostrado ser útiles en el tratamiento de la disfunción eréctil en rata. También se ha relacionado con la etiología de enfermedades inflamatorias digestivas
P2X4	ATP (nM) $\gg$ CTP, 2MeSATP (potenciado por Ivermectina)	5-BDBD	Sus niveles se encuentran incrementados en la microglia en dolor neuropático. El uso de antagonistas parece reducir este tipo de dolor en modelos murinos
P2X5	ATP (nM) = 2MeSATP = ATP $\gamma$ S $\gg$ $\alpha,\beta$ -meATP > AP <sub>4</sub> A	BBG > PPADS	Este receptor media la diferenciación celular y ejerce un efecto antiproliferativo. Actualmente los agonistas de este receptor están siendo estudiados como dianas antitumorales
P2X6	Sólo funciona como heteromultímero	–	–
P2X7	BzATP > ATP (mM)	KN62, BBG, A-438079	Se está estudiando el uso de antagonistas del receptor P2X7 para el tratamiento de la osteoporosis, ya que juega un importante papel en la regeneración ósea. Sus niveles se encuentran incrementados en patologías como diabetes, hipertensión arterial, riñón poliquístico y en la glomerulonefritis. También se ha relacionado con múltiples enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas, proponiéndose este receptor como una potencial diana terapéutica en gran variedad de patologías.

### 1.2.1. El receptor P2X7.

Este receptor fue descubierto en mastocitos y macrófagos y en un inicio se había denominado P2Z, pensando que pertenecía a una familia distinta de receptores (Gomperts, 1983; Hickman *et al.*, 1996; Surprenant *et al.*, 1996). Dentro de la familia P2X, los receptores P2X7 representan un subtipo con características estructurales y farmacológicas únicas, que han despertado un gran interés por las importantes funciones que modula en la fisiología del sistema inmune y el sistema nervioso (Di Virgilio *et al.*, 1999). Los receptores P2X7 funcionan como homotrímeros y cada subunidad consta de 595 aminoácidos, siendo la subunidad con mayor longitud de aminoácidos de todos los receptores P2X (Jiang *et al.*, 2013). Presenta la misma estructura general que los receptores P2X, con forma de delfín. Consta de 3 sitios de unión a ATP, localizados en la interfaz de las 3 subunidades, siendo necesaria la ocupación de al menos 2 de los 3 sitios de unión para la activación del receptor (Compan *et al.*, 2012). Los mamíferos carecen del residuo correspondiente a la Leu217 que está presente en el receptor zP2X4.1R de pez cebra y que es el sitio de unión del motivo ribosa (Hattori y Gouaux, 2012), responsable de que el receptor P2X7 tenga 100 veces menos afinidad por el ATP que otros receptores P2X y una mayor afinidad por su agonista farmacológico BzATP (Jiang *et al.*, 2013).

Existen 4 características básicas para distinguir la actividad de un receptor P2X7:

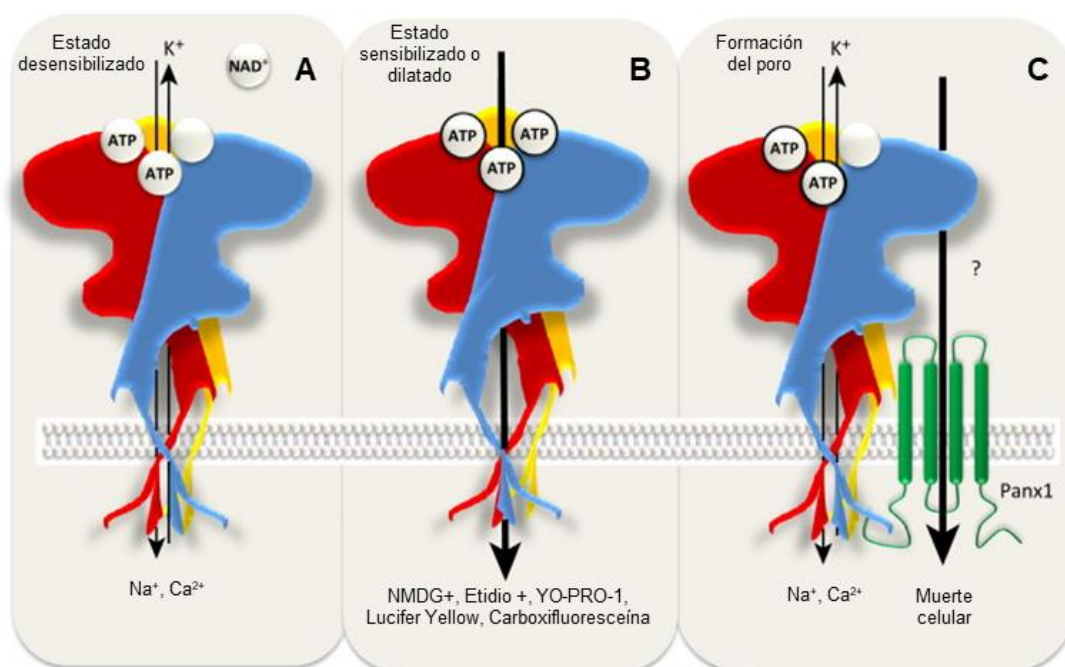
- 1) El requerimiento de concentraciones de ATP superiores a 100  $\mu\text{M}$  (Cockcroft y Gomperts, 1979; Tatham y Lindau, 1990).
- 2) El hallazgo de que BzATP es de 10 a 30 veces más potente que el ATP, aunque no es selectivo para P2X7, pudiendo estimular otros receptores P2X (Bianchi *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 1995).
- 3) El hecho de que el efecto del ATP y BzATP es mucho más potente cuando se reduce la concentración extracelular de iones calcio o magnesio (Surprenant *et al.*, 1996). Probablemente porque la forma  $\text{ATP}^{4-}$  sea más activa, aunque no hay evidencia directa de ello (Virginio *et al.*, 1997). El receptor P2X7 puede ser inhibido de manera alostérica por los iones zinc y cobre, a diferencia de otros P2X, en los que la presencia de estos iones facilita las corrientes iónicas (North, 2002).
- 4) La observación de que las corrientes iónicas promovidas por la estimulación del receptor P2X7 pueden sufrir cambios, en cuanto a tiempo y amplitud, con aplicaciones repetidas del mismo agonista. Se cree que se pueden producir cambios a largo plazo en el receptor P2X7 mediados por procesos de fosforilación-desfosforilación. Kim y colaboradores demostraron que el receptor P2X7 podría ser desfosforilado en su tirosina 343 como resultado de una exposición prolongada al agonista (Kim *et al.*, 2001).

La activación del receptor P2X7 da lugar a la apertura del poro del canal permitiendo el paso de cationes pequeños ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), siendo especialmente permeable a  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, como característica remarcable de este receptor cabe destacar la apertura de un poro no-selectivo en respuesta a estimulaciones repetidas o prolongadas, permitiendo el paso de cationes orgánicos de gran tamaño de entre 600-800 Da, como



N-metil-D-Glucamina<sup>+</sup>, Etidio<sup>+</sup> y YO-PRO1. El dominio C-terminal (Alloisio *et al.*, 2010) y la región transmembrana TM2 (Sun *et al.*, 2013) son esenciales para la formación de este poro. Recientes estudios han revelado que la conformación abierta del canal P2X7 puede permitir el paso de tintes fluorescentes cargados negativamente como Lucifer Yellow y carboxifluoresceína, con diámetros moleculares por encima de 1,4 nm (Browne *et al.*, 2013). La ocupación de 1 ó 2 de los sitios de unión del agonista favorece la transición al estado desensibilizado, mientras que la ocupación del tercer sitio favorece la transición al estado sensibilizado/dilatado (Khadra *et al.*, 2013) (Figura 10).

Un mecanismo alternativo implica el reclutamiento de una proteína adicional formadora del poro, el hemicanal Panx-1 (Panexina-1). Esta evidencia deriva de estudios en los que se usaron modelos *knock down* para Panx-1 indicando que esta proteína era esencial para la formación del poro (Thi *et al.*, 2012). La apertura de este poro podría ser responsable de la formación de abultamientos en la membrana plasmática y de la muerte celular, aunque esto no es una consecuencia obligatoria de la activación del receptor en todos los sistemas (Sorge *et al.*, 2012).



**Figura 10. La estructura simplificada del receptor P2X7 en estado abierto y durante la formación de poros en la membrana.** (A) El receptor P2X7 en estado activo forma una estructura similar a un cáliz. Los sitios de unión de los agonistas están situados en las hendiduras que se forman entre las subunidades. Además del ATP, el receptor P2X7 de ratón también podría ser activado por NAD<sup>+</sup> a través de ADP-ribosilación. (B y C) La activación prolongada y/o repetida del receptor P2X7 y la ocupación del tercer sitio de unión del agonista hace que la membrana sea permeable para cationes y colorantes orgánicos de alto peso molecular. (B) Un mecanismo potencial de la formación del poro es la dilatación del propio canal iónico. (C) Aunque también podrían formarse poros de mayor tamaño mediante la unión de otras proteínas adicionales como la Panx-1, que interaccionarían con el dominio C-terminal del receptor, promoviendo la apoptosis (Sperlagh y Illes, 2014).

El primer ADNc quimérico que codificaba el receptor P2X7 se obtuvo a partir de fragmentos solapantes aislados de ganglio cervical superior y de la habénula media de rata. Los ADNc de secuencia completa se secuenciaron a partir de una librería de ADNc de cerebro de rata (Surprenant *et al.*, 1996), mientras que los ADNc de los receptores

humanos (Rassendren *et al.*, 1997) y de ratón (Chessell *et al.*, 1998) se clonaron de monocitos y células microgliales, respectivamente.

Existen gran cantidad de variantes de procesamiento del ARNm del receptor P2X7 en mamíferos. La isoforma naturalmente truncada P2X7B carece del C-terminal debido a la inclusión de un intrón entre los exones 10 y 11 del gen, resultando en un nuevo codón de parada. Además, el nuevo codón de parada introduce 18 aminoácidos alternativos después del dominio TM2. P2X7B se expresa ampliamente en tejidos humanos en el bazo, los ganglios linfáticos, las amígdalas del timo, los leucocitos, la médula ósea, el hígado fetal, los pulmones, el cerebro y los testículos (a nivel del ARNm). La expresión exógena de P2X7B resulta en una disminución de la actividad del canal iónico y en la formación de poros no funcionales. P2X7A y P2X7B forman heterotrímeros funcionales que potencian la actividad del canal, la formación de poros, la zeiosis (formación de ampollas en las membranas) y el aumento de los niveles intracelulares de ATP y  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que resulta en la activación de NF-ATc1 y la proliferación de linfocitos (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005; Adinolfi *et al.*, 2010).

Otra isoforma del receptor P2X7 de ratón (P2X7 (k)) difiere de la forma original en su sensibilidad a la ADP-ribosilación (Nicke *et al.*, 2009; Schwarz *et al.*, 2012). P2X7K contiene un exón alternativo localizado en la región intrónica entre el exón 1 y 2, que reemplaza el N-terminal y el 80% del segmento transmembrana TM1. El P2X7K se expresa en el bazo, el hígado, los pulmones y los músculos esqueléticos de los roedores, y preferentemente en linfocitos T; en el ratón *knock out* de Glaxo se expresa en el bazo, pero no en los macrófagos de la médula ósea. El P2X7K también se ha localizado en células madre embrionarias murinas. Esta isoforma da lugar a un receptor funcional con mayor sensibilidad a BzATP que a ATP, y a una mayor dilatación de los poros. Forma heterotrímeros funcionales con P2X7A con propiedades intermedias de ambas isoformas (Nicke 2009; Shwarz 2012; Thompson 2012; Xu 2012).

Asimismo, el gen que codifica el receptor P2X7 humano es bien conocido por mostrar una gran variedad de NS-SNPs (Polimorfismos Nucleotídicos Solitarios no sinónimos), que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos y en la expresión de distintas variantes de P2X7, incrementando así la variedad estructural del receptor. Determinados NS-SNPs en humanos se han relacionado con enfermedades del sistema nervioso central como la esclerosis múltiple (Fuller *et al.*, 2009) o el trastorno depresivo mayor (Lucae *et al.*, 2006).

### 1.2.2. Fisiología del receptor P2X7.

Durante décadas se ha considerado el receptor P2X7 como un receptor exclusivo de células del sistema inmune, en las cuales su activación induce la muerte celular (Zanovello *et al.*, 1990; Chow *et al.*, 1997; Ferrari *et al.*, 1999). El papel más importante del receptor P2X7 es la regulación de la respuesta de citoquinas. De hecho, el receptor P2X7 es un elemento clave en la regulación del complejo molecular conocido como inflammasoma, proveyendo el estímulo externo necesario para la modificación postraduccional y la consiguiente liberación de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ . El papel del receptor P2X7 ha sido confirmado en la regulación central de la respuesta de citoquinas tras la estimulación con LPS (Csolle y Sperlagh, 2010).

Actualmente se sabe que se expresa en otros linajes celulares, y cada vez existen más evidencias que apuntan a un papel promotor de la proliferación celular, que podría ser

debido a la expresión de determinadas variantes del receptor (Sperlagh *et al.*, 2006; Bartlett *et al.*, 2014). Se ha comprobado que la presencia del receptor P2X7 en células tumorales, concretamente en neuroblastoma infantil, así como en la línea celular de neuroblastoma murino N2A, favorece la supervivencia y proliferación de estas células, promoviendo el crecimiento tumoral, así como su vascularización (Amoroso *et al.*, 2015; Gomez-Villafuertes *et al.*, 2015; Sperlagh *et al.*, 2006).

### 1.2.3. Papel del receptor P2X7 en el sistema nervioso.

La presencia del receptor P2X7 en el sistema nervioso ha sido fuente de controversia durante mucho tiempo. Los primeros estudios sugerían que este receptor no estaba presente en neuronas, debido a que no se detectaba su ARN mensajero. Tampoco era detectable por los anticuerpos, poco específicos en aquel momento. Posteriormente, estudios realizados con nuevas herramientas farmacológicas y biomoleculares como la hibridación *in situ*, la inmunodetección y la microscopía electrónica, pudieron demostrar la presencia del receptor P2X7 funcional desde estadios muy tempranos del desarrollo. Durante el desarrollo neuronal, su bloqueo promueve la diferenciación neuronal y protege frente a la muerte celular (Diaz-Hernandez *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que este receptor está presente en neuronas (Amadio *et al.*, 2002; Hervas *et al.*, 2003; Lenertz *et al.*, 2011; Wiley *et al.*, 2011), astrocitos (Nobile *et al.*, 2003; Carrasquero *et al.*, 2009) y oligodendrocitos (Matute *et al.*, 2007) de diferentes áreas cerebrales. Recientemente, un modelo de ratón con un reportero transgénico del receptor P2X7 que promueve la expresión de la proteína verde fluorescente bajo el promotor del gen *p2x7* (Engel *et al.*, 2012b; Garcia-Huerta *et al.*, 2012; Jimenez-Pacheco *et al.*, 2013) ha resultado ser una herramienta muy práctica para descubrir su distribución *in vivo*. Por ejemplo, estos ratones han sido usados para confirmar que el receptor P2X7 está sobreactivado en neuronas en el hipocampo y el neocórtex, pero no en astrocitos ni microglía, tras la inducción de convulsiones prolongadas en un modelo de epilepsia (Engel *et al.*, 2012a; Jimenez-Pacheco *et al.*, 2013). Estos datos son indicativos del relevante papel del receptor P2X7 en la fisiopatología del sistema nervioso.

El receptor P2X7 desempeña funciones clave en múltiples aspectos de la fisiología neuronal, incluyendo el crecimiento y la formación de ramificaciones en los axones, así como la liberación de neurotransmisores. El crecimiento axonal y su dirección son aspectos clave en la diferenciación del neuroblasto a neurona. Una vez las neuronas alcanzan su posición óptima inician la elongación de sus axones hasta sinaptar con su neurona diana, generando los circuitos neuronales (da Silva y Dotti, 2002). En cultivos de neuronas hipocámpales, se observó que un pulso de ATP inducía el incremento de los niveles de  $Ca^{2+}$  en el cono de crecimiento axonal (Diaz-Hernandez *et al.*, 2008). Este influjo local de calcio se correlacionaba con cambios en el crecimiento y la morfología neuronal, y este proceso estaba mediado por la CaMKII. El uso de antagonistas del receptor P2X7 inducía un significativo incremento en la longitud y la ramificación del axón (Diaz-Hernandez *et al.*, 2008). Además, se ha visto que la inhibición farmacológica o la delección específica del receptor P2X7 mediante ARN de interferencia, favorece la diferenciación de la línea de células tumorales N2A, incrementando la formación de neuritas y el crecimiento axonal (Gómez-Villafuertes *et al.* 2009).

Teniendo en cuenta sus importantes funciones relacionadas con el mantenimiento de la diferenciación, la inflamación y el balance entre supervivencia y apoptosis, el receptor



P2X7 se apunta como una importante diana terapéutica para distintos tipos de procesos de daño cerebral o traumático, así como en enfermedades neurodegenerativas y trastornos neurológicos (Sperlagh y Illes, 2014; Miras-Portugal *et al.*, 2017). En base al aparente efecto neurotóxico atribuido a la estimulación del receptor P2X7 resultante de la sobreproducción de ATP en situaciones de estrés y daño cerebral, la administración *in vivo* de antagonistas del receptor P2X7 se perfila como una importante alternativa terapéutica. A tal efecto, se ha comprobado que la inhibición del receptor P2X7 atenúa la muerte neuronal y la patología en modelos animales de enfermedades neuronales, incluyendo la enfermedad de Huntington (Díaz-Hernández *et al.*, 2009), Parkinson (Carmo *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017), Alzheimer (Díaz-Hernández *et al.*, 2012; Irwin *et al.*, 2016), epilepsia (Jiménez-Pacheco *et al.*, 2016; Engel *et al.*, 2012a) y convulsiones asociadas a hipofosfatasa (Sebastián-Serrano *et al.*, 2016), así como en modelos animales de daño cerebral inducido por isquemia (Arbeloa *et al.*, 2012; Maraula *et al.*, 2014) o daño traumático en la médula espinal (Marcillo *et al.*, 2012).

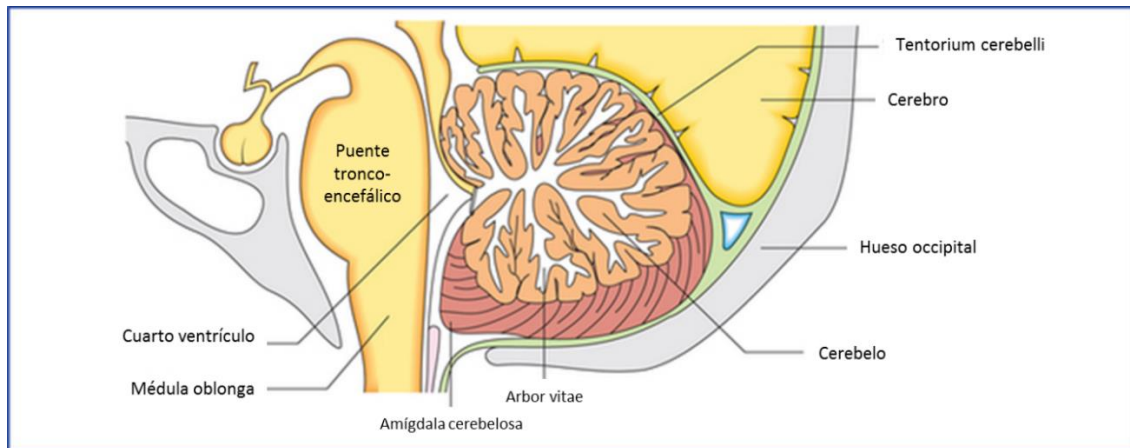
Nuestro grupo ha contribuido notablemente al estudio y la caracterización del receptor P2X7 en diferentes preparaciones del sistema nervioso y de manera muy especial en neuronas y astrocitos de cerebelo de roedores. Elegimos esta área de cerebro porque *a priori* presentaba ventajas adicionales frente a otras estructuras como su mayor accesibilidad, debido a que se desarrolla después del nacimiento, y recibe aferencias aminérgicas, en las cuales se podrían estar almacenando y liberando nucleótidos. Además, como se detalla a continuación no sólo es responsable del control del movimiento, sino que también está implicado en funciones cognitivas y afectivas.

## **El cerebelo.**

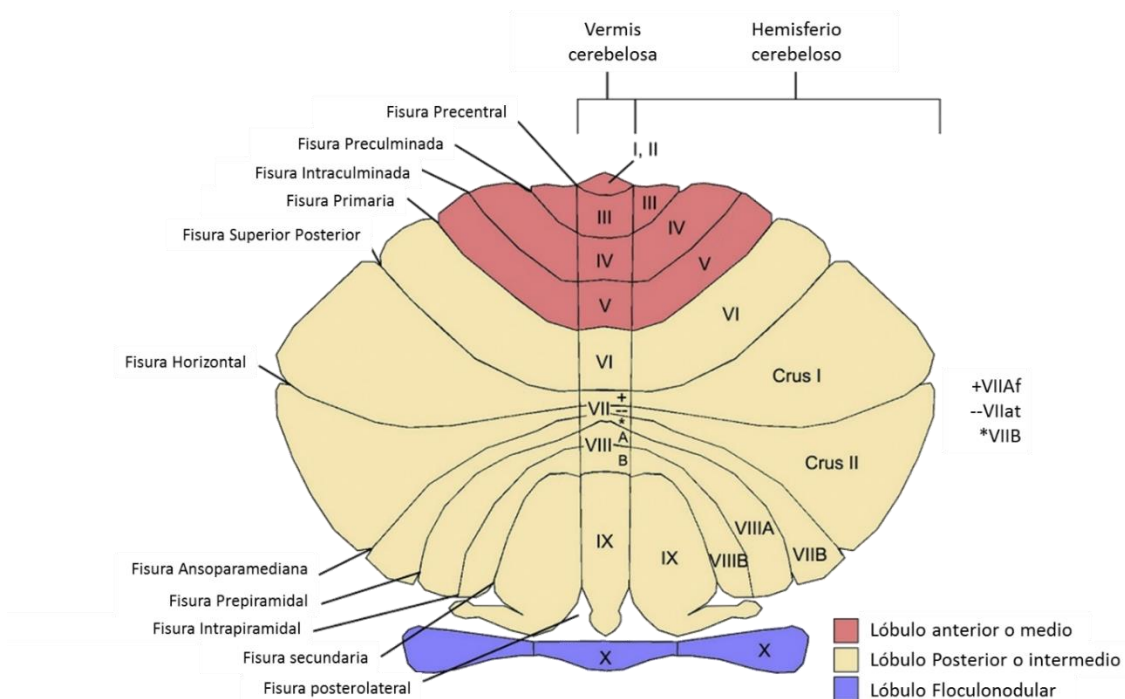
El cerebelo (del latín “pequeño cerebro”) es una importante región del sistema nervioso central. Ocupa aproximadamente una décima parte del tamaño del cerebro y se encuentra situado en la fosa craneal posterior. Pese a su pequeño tamaño supone, al menos, el 80 % del total de las neuronas del cerebro (Herculano-Houzel, 2009). Clásicamente se le han atribuido al cerebelo funciones de control y de aprendizaje motor, iniciación del movimiento, coordinación, precisión, suavidad y armonía de los movimientos voluntarios. Sin embargo, en los últimos años se acumulan evidencias que indican que la función cerebelosa va más allá del control sensoriomotor.

### **1. Anatomía del cerebelo.**

El cerebelo tiene una localización posterior al tronco cerebral y al cuarto ventrículo y se encuentra rostralmente separado del cerebro mediante una extensión de la duramadre denominada *tentorium cerebelli*. En el ser humano está constituido por dos hemisferios laterales, separados por una estrecha zona central denominada vermis (del latín “gusano”), su superficie está caracterizada por la presencia de múltiples pliegues paralelos que cruzan la línea media, sin solución de continuidad, denominados *folia* (Figura 11). El cerebelo está conformado por una capa externa altamente circunvolucionada de materia gris denominada corteza cerebelosa que rodea a una zona de materia blanca altamente arborizada denominada *Arbor vitae* (del latín “árbol de la vida”), que a su vez rodea los 3 pares de núcleos cerebelosos profundos que se encuentran embebidos en la materia blanca cerebelosa (*corpus medullare*). Desde el medial al lateral, estos núcleos se denominan núcleo fastigial, núcleo interpuesto y núcleo dentado. Además de las dos fisuras transversas que dividen los 3 lóbulos del cerebelo, éste también se encuentra dividido en 10 lóbulos transversos nombrados mediante números romanos (I-X) (Figura 12).



**Figura 11. Sección sagital del tallo cerebral y el cerebelo.** El cerebelo está conectado al tallo cerebral por tres pares de fibras largas denominados pedúnculos cerebrales. Figura adaptada de (Rhoton, 2000).



**Figura 12. Representación del cerebelo con sus fisuras mayores, lóbulos y lobulillos.** El lóbulo anterior (lobulillos I al V) está sombreado en rojo; el lóbulo posterior (lobulillos del VI al IX) en color beige, y el lóbulo floculonodular (lobulillo X) en morado. Los lóbulos I a X se localizan en la vermis y en los hemisferios. El lobulillo VII, VIIAf en la vermis, se expande en el hemisferio para convertirse en Crus I, el lobulillo VIIat en la vermis se fusiona con Crus II en el hemisferio, y el lobulillo VIIIB conserva su denominación tanto en la vermis como en los hemisferios. Figura adaptada de (Schmahmann, 2019).

Se encuentra unido al tronco cerebral mediante 3 pedúnculos (inferior, medio y superior). Todas las fibras aferentes y eferentes del cerebelo se conectan con sus dianas a través de estos pedúnculos. El pedúnculo medio es el más largo y está compuesto casi exclusivamente por las fibras pontocerebelares. El pedúnculo inferior está compuesto principalmente por cuerpos restiformes (aferentes) y yuxtarestiformes (eferentes). El lóbulo superior, por su parte, está compuesto por fibras eferentes que

van desde el núcleo dentado e interpuesto y, en menor medida, desde el núcleo fastigial (Roostaei *et al.*, 2014).

Aunque desde el punto de vista anatómico el cerebelo se encuentre dividido en 3 lóbulos transversales, su estructura está dividida funcionalmente de manera longitudinal, pudiendo distinguir 3 partes: el lóbulo flocculonodular (arqueocerebelo o vestibulocerebelo) la parte más primitiva del cerebelo, el lóbulo medio (coincidente con la vermis) y el intermedio (paravermis), estos dos últimos también conocidos como espinocerebelo, y la región más externa de los hemisferios se denomina cerebrocerebelo (Eric R. Kandel, 2013).

El vestibulocerebelo recibe, entre otras, aferencias del mesencéfalo y del córtex visual. El vestibulocerebelo medio controla la musculatura axial, manteniendo la postura corporal, mediante la modulación del núcleo vestibular, mientras que el vestibulocerebelo lateral está implicado en el movimiento ocular y la coordinación de movimientos de ojo y cabeza. Este reflejo vestibulo-ocular es la rotación compensatoria de los ojos durante los movimientos de la cabeza para poder fijar las imágenes en la retina (Broussard *et al.*, 2011).

El espinocerebelo recibe información somatosensorial directa e indirectamente del tronco y las extremidades a través de sus conexiones con la médula espinal, y de la cabeza y la cara a través del nervio trigémino y los sistemas visuales y auditivos. Esta región del cerebelo está implicada en el control de la musculatura axial y proximal y contribuye al control postural y al equilibrio. Las lesiones en esta región se han relacionado con alteraciones motoras oculares tales como dismetría sacádica y/o anomalías en la vergencia de los ojos.

El cerebrocerebelo, también denominado neocerebelo, está conectado de manera recíproca con la corteza cerebral. Esta parte, de manera homóloga a lo que ocurre con el cerebro, está ampliamente desarrollada en humanos (Herculano-Houzel, 2009). Recibe entradas exclusivamente de la corteza cerebral, concretamente del lóbulo parietal, formando la vía corticopontocerebelosa. Mientras que esta región del cerebelo emite eferencias a través del núcleo dentado y los núcleos talámicos hacia las áreas motoras y premotoras de la corteza cerebral y del lóbulo frontal. Esta zona del cerebelo está implicada en la planificación motora, el inicio del movimiento y la coordinación motora de movimientos que requieren precisión y alto grado de complejidad, actuando como centro integrador de las órdenes motoras corticales. Además, se ha relacionado recientemente en varias funciones cognitivas (Roostaei *et al.*, 2014).

### **1.1. La corteza cerebelosa.**

En los mamíferos, el cerebelo está formado por múltiples tipos de neuronas, que se pueden clasificar en excitadoras o inhibitoras (Butler, 1996; Joseph Altman, 1997; Bae *et al.*, 2009). Las neuronas excitadoras emplean glutamato como principal neurotransmisor (neuronas glutamatérgicas). Dentro de este grupo se incluyen las células granulares, las células unipolares en cepillo y las neuronas procedentes de los núcleos cerebelosos profundos (Butler, 1996; Meek *et al.*, 2008). Las neuronas inhibitorias emplean GABA (Ácido  $\gamma$ -Aminobutírico) y/o glicina (neuronas gabaérgicas) e incluyen a las células de Purkinje e interneuronas como las células de Golgi, las células de Lugaro, las células en candelabro, las células estrelladas y las células en cesta (Butler, 1996; Joseph Altman, 1997).

Las neuronas cerebelosas reciben impulsos excitatorios de neuronas de los núcleos precerebelosos, fuera del cerebelo, y existen dos principales tipos de fibras aferentes: las fibras trepadoras y las fibras musgosas. Las fibras trepadoras provienen de los núcleos inferiores de la oliva en el rombencéfalo posterior, e inervan el dominio proximal de las dendritas de las neuronas de Purkinje. Por su parte, las fibras musgosas originadas de neuronas en los núcleos precerebelosos (a excepción de los núcleos de la oliva) como el núcleo vestibular, establecen sinapsis con las dendritas de las células granulares, que están en contacto con los axones de las células de Golgi, para formar el glomérulo cerebeloso. La información de las fibras musgosas es transportada a las dendritas de las células de Purkinje a través de los axones de las células granulares, que se bifurcan en la capa molecular de la corteza cerebelosa dando lugar a las denominadas fibras paralelas. A lo largo de su recorrido, cada fibra paralela puede inervar a 300 células de Purkinje. Así pues, la información de las fibras trepadoras y de las fibras musgosas es integrada por las células de Purkinje (Figura 13) (Ito, 2002).

Por otro lado, también cabe destacar la presencia de células gliales como los oligodendrocitos, la microglía y los astrocitos. Dentro de estas últimas, cobra especial importancia la glía de Bergmann, ya que está presente desde estadios muy tempranos del desarrollo y tiene como principal función actuar como guía en la migración de las células de Purkinje y las células granulares. A diferencia de la glía radial de otras áreas del cerebro, la glía de Bergmann posee múltiples ramificaciones radiales en lugar de un proceso único y además también participa en la poda sináptica (Sild y Ruthazer, 2011; Xu *et al.*, 2013).

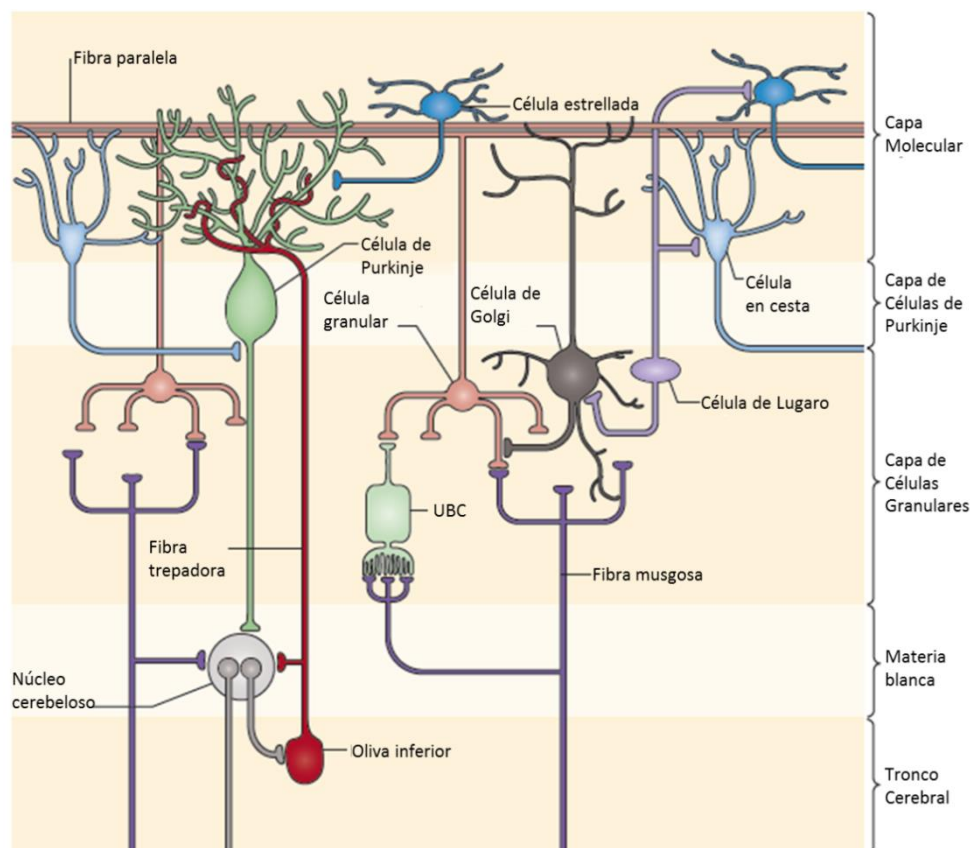
Todas estas neuronas y fibras neuronales conforman la citoarquitectura de la corteza cerebelosa, compuesta de 3 capas, las cuales se denominan, de la más externa a la más interna: Capa molecular, capa intermedia y capa granular (Figura 13).

La capa más externa, también denominada capa molecular, alberga el árbol dendrítico de las neuronas de Purkinje, así como los axones de las neuronas granulares, proyectados desde la capa granular, que establecen sinapsis con las dendritas de las neuronas de Purkinje a través de la emisión de las denominadas “fibras paralelas”. En esta capa también se pueden encontrar numerosas interneuronas de tipo inhibitorio como son las neuronas estrelladas y las neuronas en cesta, que emiten sus axones hacia capas más profundas de la corteza cerebelosa, así como los terminales nerviosos de las fibras trepadoras y las fibras de la glía de Bergmann.

En la capa intermedia o capa de Purkinje, encontramos los somas de las neuronas de Purkinje dispuestos de manera ordenada. Embebidas entre estas neuronas, encontramos los somas de la glía de Bergmann y, en menor número, las neuronas en candelabro. Las neuronas de Purkinje emiten sus axones hacia la materia blanca y los núcleos profundos del cerebelo, siendo la única vía eferente del cerebelo.

En la capa más profunda del cerebelo o capa granular se encuentran, principalmente, las neuronas granulares, que son las neuronas más abundantes del cerebro (White y Sillitoe, 2013). Esta capa recibe este nombre debido al pequeño tamaño y a lo densamente empaquetadas que se encuentran estas neuronas, que emiten sus axones hacia la capa molecular, donde se bifurcan dando lugar a las fibras paralelas. Poseen de 4 a 5 dendritas por célula, que establecen sinapsis con los axones engrosados o en roseta de las fibras musgosas, donde también convergen los axones de las células de Golgi, dando lugar a los denominados glomérulos cerebelosos. En esta capa también

podemos encontrar las células de Lugaro, con una función similar a las células de Golgi, y las células en cepillo, que establecen contacto con las células granulares a través de las fibras musgosas (Xu *et al.*, 2013; White y Sillitoe, 2013; Hibi y Shimizu, 2012; Apps y Garwicz, 2000) (Figura 13).



**Figura 13. La citoarquitectura cerebelosa** básica comprende las células de Purkinje, las células granulares, las células de Golgi, las células de Lugaro, las células unipolares en cepillo (UBC), y las interneuronas que comprenden las células estrelladas y las células en cesta. Los dos tipos principales de aferencias que se proyectan al cerebelo son las fibras trepadoras, que establecen sinapsis directamente con las células de Purkinje, y las fibras musgosas, que establecen sinapsis con las células granulares. Los axones de las células granulares ascienden hasta la capa molecular, donde se bifurcan en forma de T formando fibras paralelas, que se extienden durante varios milímetros a lo largo de la folia de los lóbulos cerebelosos. Imagen adaptada de (Cermínara *et al.*, 2015).

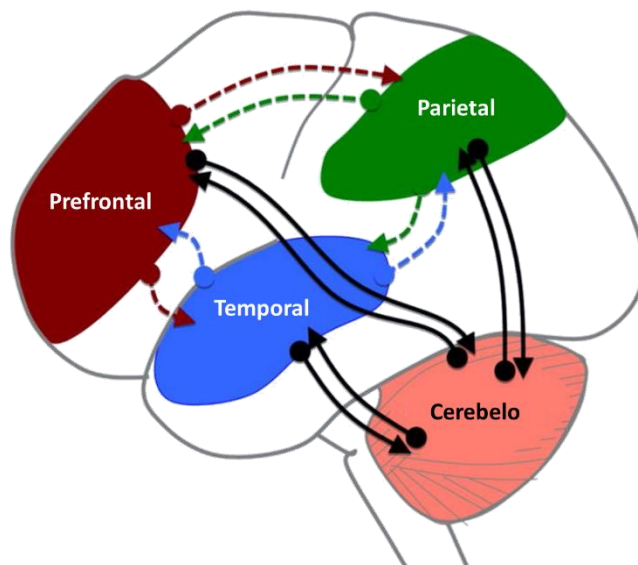
## 2. Avances en el estudio del cerebelo.

Estudios de neuroanatomía, neuroimagen, neuropsicología y estimulación cerebral han revelado que el cerebelo también está involucrado en funciones cognitivas (Koziol y Lutz, 2013; Buckner, 2013), afectivas (Moreno-Rius, 2018), del lenguaje (Marien y Beaton, 2014), atención y función ejecutiva (Sokolov *et al.*, 2017). Estos estudios comenzaron en la década de los 80 (Leiner *et al.*, 1986; 1989; 1993) evidenciándose que el cerebelo humano contenía regiones conectadas a otras áreas asociativas del cerebro. Recientemente se ha relacionado también con ciertas patologías como el autismo (Wang *et al.*, 2014), fobias y trastornos relacionados con la ansiedad (Moreno-Rius, 2018), trastorno bipolar y esquizofrenia.

Las conexiones entre el cerebelo y las redes cognitivas corticales han sido ampliamente descritas. El cerebelo recibe información de áreas de la corteza a través del puente del cerebelo y proyecta hacia la corteza a través del tálamo, formando un circuito cerrado. Los procesos cognitivos complejos como el lenguaje o la cognición social requieren



interacciones entre distintas regiones del córtex cerebral (Figura 14), de modo que este circuito cerrado podría sugerir que la información procedente del cerebelo podría modular esta red de componentes (Sokolov *et al.*, 2017).



**Figura 14. Interacciones entre el cerebelo y las redes cognitivas corticales.** El cerebelo recibe información de la corteza cerebral a través del Puente Tronco-encefálico y se proyecta a su vez a áreas similares a través del tálamo, formando un circuito cerrado (flechas negras). Los procesos cognitivos complejos como el lenguaje o la cognición social requieren interacciones entre las distintas regiones de la corteza cerebral (flechas de color y punteadas). Así, este circuito sugeriría que el cerebelo podría contactar con el resto de áreas del cerebro, dando lugar a un complejo proceso cognitivo en su conjunto. Siendo las conexiones cortico-corticales un medio para expandir la influencia del cerebelo hacia el cerebro. Imagen adaptada de (Sokolov *et al.*, 2017).

Algo similar ocurre a nivel del lenguaje, debido a la observación de pacientes con daños cerebelosos, donde se han observado alteraciones sensoromotoras, cognitivas y en el procesamiento del lenguaje, relacionándose el cerebelo con funciones auditivas centrales, percepción del discurso y otros procesos lingüísticos como el tiempo de discurso, aspectos fonológicos del léxico y otros eventos verbales (Marien y Beaton, 2014).

El importante papel del cerebelo en múltiples funciones no motoras queda patente en la patología denominada síndrome afectivo-cognitivo cerebelar cogiendo fuerza la teoría de la “dismetría del pensamiento”, una hipótesis que plantea el cerebelo como una estructura paralela al cerebro con una organización topográfica similar y con conexiones entre ambos, atribuyéndole al cerebelo una contribución en la funciones, no sólo motoras, sino cognitivas y límbicas del cerebro (Schmahmann, 1991).

Otras patologías cerebelosas, como las ataxias espinocerebelosas, ponen de manifiesto componentes no sólo motores del cerebelo, sino también cognitivas y del comportamiento (Koziol y Lutz, 2013). Así, también se ha relacionado una mala función cerebelosa con enfermedades neuropsiquiátricas como la esquizofrenia donde, además de relacionarse la función cerebelosa de estos pacientes con una pobre coordinación motora, se han evidenciado alteraciones estructurales del cerebelo mediante técnicas de neuroimagen, incluyendo una disminución del volumen cerebeloso y menor espesor del mismo, así como un flujo sanguíneo alterado (Wassink *et al.*, 1999; Nopoulos *et al.*, 1999). También se han establecido relaciones entre el cerebelo y el autismo, debido al

hallazgo de alteraciones en la estructura y función neuronal del cerebelo en enfermedades del espectro autista (Becker y Stoodley, 2013 CJ., 2013).

### **3. Las neuronas granulares como modelo de estudio.**

Como se ha mencionado anteriormente, las neuronas granulares son uno de los tipos celulares más abundantes en el cerebelo, representando el 90% del total de neuronas de esta estructura, y constituyen la población neuronal homogénea más abundante en el cerebro de mamíferos. Se trata de neuronas con un soma de pequeño tamaño (5-10  $\mu\text{m}$ ), el cual se encuentra prácticamente ocupado en su totalidad por el núcleo celular. Cada neurona granular presenta en total 4 prolongaciones dendríticas cortas (12-20  $\mu\text{m}$ ) y presenta axones desmielinizados que pueden llegar a tener un tamaño de 6 mm (Lackey *et al.*, 2018). Fueron identificadas por primera vez en las últimas décadas del s. XIX, al realizarse los primeros estudios histológicos y celulares de la corteza de cerebelo (Obersteiner, 1880; Athias, 1897). A partir de estas investigaciones, D. Santiago Ramón y Cajal realizó sus estudios de desarrollo del cerebelo, describiendo la neurogénesis postnatal de estas neuronas hace más de 100 años (Ramon y Cajal, 1911). El desarrollo postnatal del cerebelo permite llevar a cabo cultivos bastante purificados y de manera relativamente sencilla de neuronas granulares. Estas células se obtienen de cerebelos en un periodo postnatal temprano (primeros 5-7 días de vida), pudiendo ser cultivadas en un medio de composición definida durante periodos relativamente largos de tiempo. Las neuronas granulares constituyen un excelente modelo de estudio para las rutas de señalización intracelulares y los mecanismos moleculares y celulares de los fenómenos de apoptosis y supervivencia celular y, por tanto, fenómenos de neurodegeneración y neuroregeneración *in vitro* (Contestabile, 2002). La principal característica de estos cultivos celulares es la necesidad de mantenerlos en condiciones de alta concentración de  $\text{K}^+$  (> 20mM), ya que a concentraciones fisiológicas de  $\text{K}^+$  (< 5mM) se produce una apoptosis progresiva del cultivo (Gallo *et al.*, 1987; Balazs *et al.*, 1988). Esto es debido a que es necesario mantener un estado de constante despolarización que permita un incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, mimetizando las conexiones que se establecen *in vivo* con las fibras musgosas durante el desarrollo de las neuronas granulares en el cerebelo. Estas elevadas concentraciones de potasio, además protegen frente al daño excitotóxico de la entrada masiva de calcio a través de la activación de los receptores de NMDA (Ácido N-Metil-D-Aspártico) (Gallo *et al.*, 1987). De hecho, este es el mecanismo mediante el cual las fibras musgosas invaden la capa granular al mismo tiempo que se produce la eliminación por apoptosis de las neuronas granulares postmigratorias (Contestabile, 2002).

Múltiples estudios han demostrado la buena correlación entre el desarrollo del cerebelo y el desarrollo durante el cultivo de las neuronas granulares, lo que hace de estas células también un buen modelo para el estudio del efecto de los factores neurotróficos relacionados con el desarrollo, diferenciación o supervivencia neuronal.

#### 4. Antecedentes del grupo: Señalización purinérgica en cerebelo.

La neurotransmisión purinérgica parece jugar un importante papel en el cerebelo, las neuronas de Purkinje, neuronas granulares y la glia de Bergmann expresan una gran variedad de receptores purinérgicos (Collo *et al.*, 1996; Kanjhan *et al.*, 1996; Vulchanova *et al.*, 1996; Collo *et al.*, 1997; Loesch y Burnstock, 1998; Amadio *et al.*, 2007; Rudolph *et al.*, 2016; Mateo *et al.*, 1998; Garcia-Lecea *et al.*, 1999). En nuestro grupo de investigación se ha estudiado ampliamente el papel de la señalización mediada por nucleótidos en las neuronas granulares y astrocitos cerebelosos. Las neuronas granulares expresan una gran variedad de receptores metabotrópicos, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>13</sub>, e inotrópicos, receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>6</sub> y P2X<sub>7</sub>. Cabe destacar la presencia a nivel del soma neuronal de P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>3</sub> y una importante expresión a nivel axodentrítica de P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> y P2X<sub>7</sub>, siendo estos dos últimos los más abundantes a nivel presináptico (Hervas *et al.*, 2003; 2005). Los astrocitos expresan preferentemente receptores de tipo metabotrópico y el receptor ionotrópico P2X<sub>7</sub> (Jimenez *et al.*, 2000; Carrasquero *et al.*, 2009).

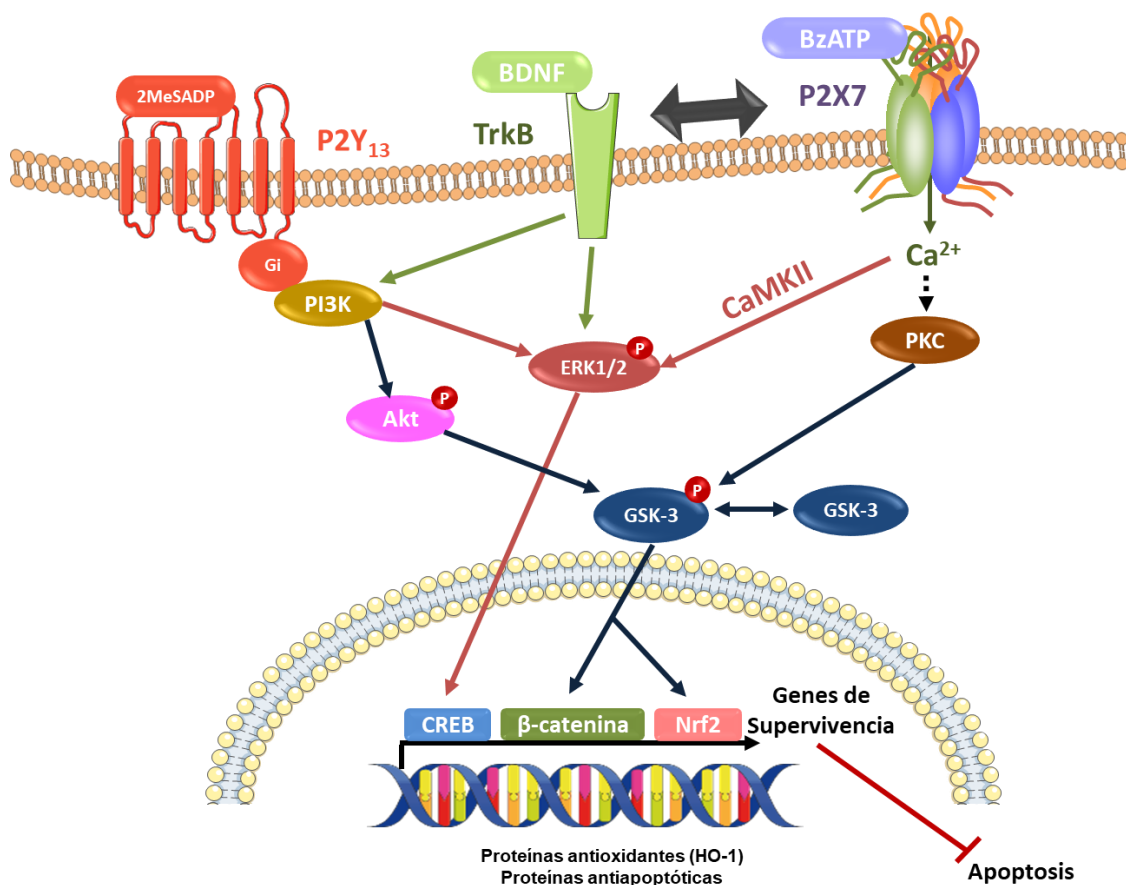
Nuestro grupo ha sido pionero en la caracterización funcional del receptor P2Y<sub>13</sub> y las vías de señalización activadas tras su estimulación en las neuronas granulares y en astrocitos de cerebelo de rata. El receptor P2Y<sub>13</sub> a través de su señalización vía proteína Gi y la subsiguiente activación de la vía PI3K/Akt/GSK3, ejerce efectos neuroprotectores frente a diversos estímulos apoptóticos. La fosforilación de GSK3 en el residuo Ser 9,21 (para las isoformas β y α, respectivamente), la inactiva evitando la fosforilación de Nrf2, que es un factor de transcripción implicado en la expresión de genes antioxidantes (Cuadrado, 2015; Ortega *et al.*, 2008). La acumulación citoplasmática de Nrf2 permite su translocación nuclear, y la expresión de genes antioxidantes como la Hemo oxigenasa-1 (HO-1), cuya expresión se ve incrementada por la estimulación del receptor P2Y<sub>13</sub> con el agonista 2MeSADP, explicando su efecto neuroprotector frente al estrés oxidativo (Cuadrado *et al.*, 2018; Espada *et al.*, 2010; Ortega *et al.*, 2008). La estimulación del receptor P2Y<sub>13</sub> también permite la actividad del regulador transcripcional β-catenina, que se ve acumulado a nivel citoplasmático por la inactivación de GSK3 a través de la vía PI3K/Akt, evitándose así la fosforilación y degradación de β-catenina, la cual se transloca al núcleo promoviendo la transcripción de genes antiapoptóticos (Ortega *et al.*, 2008) (Figura 15).

También se ha demostrado el efecto neuroprotector que ejerce el receptor P2X<sub>7</sub> en las neuronas cerebelosas. De hecho, las neuronas granulares proporcionan un modelo en el que se pueden estudiar las acciones tróficas de este receptor. A diferencia de otros tipos neuronales de corteza e hipocampo en los que la estimulación del receptor P2X<sub>7</sub> lleva a la apertura del poro y a la muerte celular, en las neuronas cerebelosas, este receptor también es capaz de inducir la fosforilación de GSK3, en este caso a través de la activación de la PKC y de manera independiente de la vía PI3K/Akt. El receptor P2X<sub>7</sub> ejerce su efecto neuroprotector en condiciones apoptóticas de privación de factores tróficos o cuando se lleva a cabo una inhibición continuada de la vía PI3K con el compuesto LY294002. La estimulación del receptor P2X<sub>7</sub> previene la activación de la caspasa-3 en estas condiciones (Ortega *et al.*, 2009) (Figura 15).

Además de actuar sobre la vía de señalización de GSK3, tanto el receptor P2Y<sub>13</sub> como el receptor P2X<sub>7</sub> pueden ejercer también sus efectos neuroprotectores a través de la activación de las proteínas ERK1,2. En el caso de P2Y<sub>13</sub> a través de la señalización vía PI3K y en el caso de P2X<sub>7</sub> a través de la activación de CaMKII (Ortega *et al.*, 2011). La



activación de ERK1,2 incrementa los niveles de fosforilación del factor de transcripción CREB, promoviendo la expresión de genes implicados en la supervivencia celular y evitando la muerte celular inducida por concentraciones excitotóxicas de glutamato. Esta ruta neuroprotectora activada por los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7 la comparten con el receptor de BDNF (Ortega *et al.*, 2011) (Figura 15).



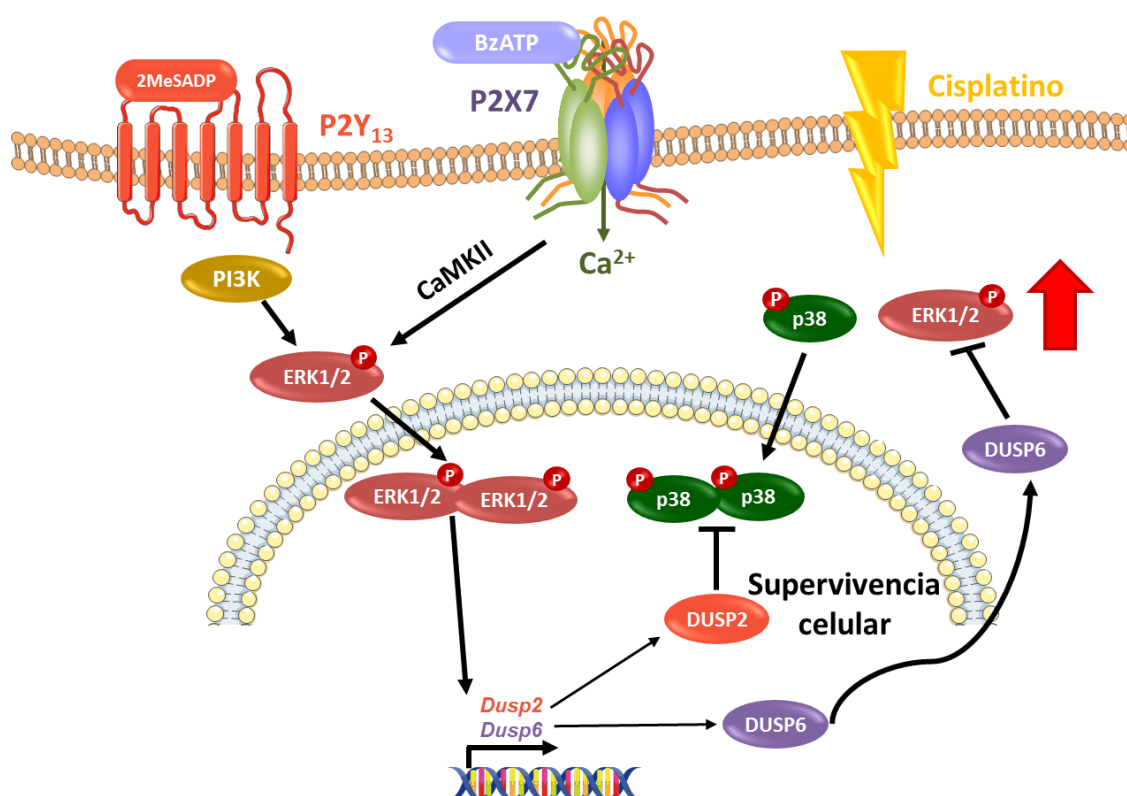
**Figura 15. Esquema resumen del efecto neuroprotector de los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7 en las neuronas granulares de cerebelo de rata.** Los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7 ejercen un efecto antiapoptótico de las neuronas granulares de cerebelo de rata frente a estímulos deletéreos tales como la retirada de factores tróficos, niveles excitotóxicos de glutamato y estrés oxidativo, a través de la activación de la señalización de las MAPKs ERK1,2, promoviendo la expresión de genes antiapoptóticos y a través de la inactivación de GSK-3, frenando la cascada de activación apoptótica. El receptor P2X7 puede colaborar con el receptor TrkB de BDNF para ejercer este efecto neuroprotector.

Además de compartir efecto neuroprotector con el receptor de BDNF, se ha comprobado que puede existir cierto grado de interacción entre los receptores P2X7 con los de BDNF y los receptores NMDA de glutamato en las neuronas granulares. De hecho, la activación de los tres tipos de receptores converge en la fosforilación e inhibición de la proteína GSK3, para promover un efecto neuroprotector aditivo frente a la inhibición farmacológica de la PI3K (Ortega *et al.*, 2010).

En estudios más recientes, también se ha corroborado el papel neuroprotector de los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7 frente al estímulo genotóxico cisplatino, un agente usado en quimioterapia con importantes efectos secundarios neurotóxicos. Este daño celular lo ejerce a través de la activación mantenida de la vía de las MAP quinasas, incrementando los niveles de fosforilación de ERK y p38. La activación prolongada de ERK y p38 pueden promover la muerte celular si se acumulan en el núcleo y activan la expresión

de genes de la ruta proapoptótica. La estimulación de los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7 previa al tratamiento con cisplatino prevenía la muerte neuronal y la recuperación de los niveles basales de las formas fosforiladas de ERK1,2 y p38. Estos datos eran indicativos de que los receptores estaban promoviendo alguna actividad proteína fosfatasa.

En estudios de análisis de expresión mediante *microarrays* realizados en neuronas granulares estimuladas con el agonista P2Y<sub>13</sub>, 2MeSADP, se pudo comprobar la up-regulación de genes relacionados con la actividad proteína fosfatasa. Entre ellos, el gen *Dusp2*, correspondiente a la fosfatasa de especificidad dual DUSP2/PAC1, resultó ser una diana del receptor P2Y<sub>13</sub>, que promovía su inducción transcripcional de manera dependiente de ERK. El gen *Dusp2* codifica una proteína fosfatasa selectiva para p38. El aumento de la expresión de DUSP2 tras la estimulación del receptor P2Y<sub>13</sub> permitió la desfosforilación de p38 a nivel nuclear, eludiendo la muerte celular (Morente *et al.*, 2014). Además, DUSP2 también era responsable de la neuroprotección ejercida por 2MeSADP frente a otros estímulos deletéreos como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o estímulos genotóxicos, como la radiación ultravioleta (resultados no publicados) (Figura 16).



**Figura 16. Esquema del efecto neuroprotector de los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7 frente a estímulos genotóxicos en neuronas granulares de cerebro de rata.** El receptor metabotrópico P2Y<sub>13</sub> es capaz de ejercer un efecto neuroprotector frente al tratamiento con el agente cisplatino, empleado en quimioterapia para el tratamiento de tumores sólidos. La estimulación del receptor promueve la expresión de la fosfatasa DUSP2 a través de la activación de ERK, revirtiendo la acumulación de p38 hiperfosforilada en el núcleo provocada por el agente citotóxico cisplatino, teniendo un efecto pro-supervivencia. Por su parte, el receptor ionotrópico P2X7 también ejercía un efecto protector frente a la apoptosis inducida por cisplatino, promoviendo la expresión de la fosfatasa DUSP6 y atenuando el incremento de la forma fosforilada de ERK1,2 en el citosol.

Por su parte, la estimulación con BzATP previa a la adición de cisplatino en las neuronas granulares de cerebelo de rata, no tenía ningún efecto previniendo la fosforilación de p38, pero sí evitaba la hiperfosforilación de ERK1,2 promovida por este tratamiento. Entre las distintas fosfatasa que pueden desfosforilar ERK1,2 de manera selectiva, nos centramos en la proteína DUSP6/MKP-3, que es capaz de desfosforilar a ERK1,2 a nivel citoplasmático. En estudios previos comprobamos que DUSP6/MKP-3 podía ser una diana del receptor P2X7, y estos estudios han servido como punto de partida para la realización de este trabajo (Morente Rodríguez, 2013).

## ***OBJETIVOS***



Con todos estos antecedentes, en este trabajo se pretende avanzar en el estudio de las proteínas fosfatasa de especificidad dual, DUSPs/MKPs, como posibles dianas de señalización de los receptores nucleotídicos, en especial del receptor P2X7, en las neuronas granulares de cerebelo. Comenzaremos con el análisis de las fosfatasas DUSP6/MKP-3 y DUSP1/MKP-1 por varios motivos. En primer lugar, porque parecen desempeñar un papel relevante en el sistema nervioso, ya que su presencia se había descrito previamente en las distintas poblaciones celulares del sistema nervioso. En segundo lugar, porque representan los arquetipos de los grupos de fosfatasas nucleares e inducibles, en el caso de DUSP1/MKP-1, y de fosfatasas citoplasmáticas y constitutivas, en el caso de DUSP6/MKP-3. Y, en último lugar, porque siendo la ruta de ERK1,2 la ruta de señalización en la que queríamos seguir investigando, ambas fosfatasas muestran especificidad de sustrato para las proteínas ERK. Siendo la fosfatasa DUSP6/MKP-3 selectiva de ERK, mientras que DUSP1/MKP-1 también puede tener a pERK entre sus sustratos, además de p38 y JNK..

Los principales objetivos que se van a abordar en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1- Análisis de la expresión de las fosfatasas de especificidad dual DUSP1 y DUSP6 a lo largo del desarrollo y diferenciación del cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata en relación con los niveles de MAPKs y del receptor P2X7.
- 2- Estudiar la regulación de la fosfatasa DUSP6 por los receptores P2X7 y de EGF en neuronas granulares de cerebelo de rata, a nivel de:
  - a. Señalización celular.
  - b. Factores de los que depende su patrón de expresión y actividad.
  - c. Estudio de la vida media de DUSP6 tanto a nivel de proteína como de ARNm y de los factores estabilizantes/desestabilizantes.
  - d. Localización subcelular de la fosfatasa.
- 3- Investigar la regulación de la fosfatasa DUSP1 por los receptores P2X7 y receptores TrkB en neuronas granulares de cerebelo de rata, en relación con:
  - a. Vías de señalización reguladas a través de la fosfatasa.
  - b. Patrón de regulación de la fosfatasa a nivel de proteína y ARNm.
- 4- Examinar la regulación de las fosfatasas DUSP1 y DUSP6 por los receptores P2X7 y TrkB en neuronas granulares de cerebelo de ratón.
  - a. Implicaciones fisiológicas: Papel de DUSP1 en la arborización dendrítica y ramificación axonal.



## ***MATERIALES Y MÉTODOS***





## **MATERIALES.**

### **1. Material biológico.**

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de ratas Wistar (machos y hembras) de 6-7 días de vida, y de ratones C57/BL6 y P2rx7-EGFP de 4-5 días.

Todos los animales fueron suministrados por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y utilizados según la normativa internacional para animales de laboratorio (ICLAS).

### **2. Instrumentación.**

Los instrumentos utilizados en la realización de esta Tesis Doctoral están recogidos en la Tabla IV.

### **3. Reactivos.**

Todos los medios y soluciones se prepararon con sales inorgánicas Merck de grado analítico (pro anal.) disueltas en agua desionizada de alta calidad y pureza. En la Tabla V se detallan los compuestos y reactivos utilizados en cada uno de los ensayos realizados, así como las casas comerciales que los suministraron. En general, cualquier sustancia no especificada en las tablas fue proporcionada por Sigma-Aldrich o Merck.

Tabla IV. Relación de los diferentes aparatos utilizados

Categoría	Instrumentación y modelo	Casa comercial
<b>Instrumentación general</b>	Granatario FX2000 Balanza de precisión Crystal 200 CAL Agitadores magnéticos Agimatic-S Agitador orbital IKA rocker 3D Agitador orbital Polymax 1040 pHmetros Pipetas automáticas Sistemas de filtración mili-Ro y Mili-Q Microfuga5414D Centrífugas 5804 R y Omnifuge 2.0 RS Neveras 4°C Congeladores -20°C Congeladores -80°C Baño termostatzado Tectron 3473100 Termobloques Termomixer Compact Espectrofotómetro Biophotometer Plus Espectrofotómetro Nano Drop	AND Arpival Selecta Arpival Labnet Crison Eppendorf y Gilson Milipore Eppendorf Eppendorf y Heraeus Liebherr Liebherr Froilabo Selecta Eppendorf Eppendorf Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific
<b>Cultivos celulares</b>	Campana de flujo laminar vertical Gelaire Twin 30 y TC 48 Autoclave de alta capacidad Presoclave-2 Placas Petri estériles Cubreobjetos de vidrio Ø 15 mm Pipetas de aspiración Pipet Aid Pipetas estériles Incubador NAPCO 5415 Filtros estériles Raspadores celulares estériles Jeringas estériles Cámara de Neubauer Microscopio de contraste de fase Wetzlar 21-D6330 Microscopio confocal TCS SPE	Cultek Selecta  Falcon Deckglässer Drummond Costar Heraeus Milipore Sterilin Falcon Arpival Wilovet  Leica
<b>Expresión génica</b>	Termociclador Gene Amp2400 Termociclador de PCR a tiempo real Step One Plus Transiluminador Gel Logic 200 Imagin System	Applied Biosystems Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific Kodak
<b>Inmunotransferencia</b>	Equipo de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Cell Equipo de transferencia Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell Detector de Quimioluminiscencia LAS 500 Membranas de transferencia PVDF	Bio Rad  Bio Rad  GE Healthcare  GE Healthcare

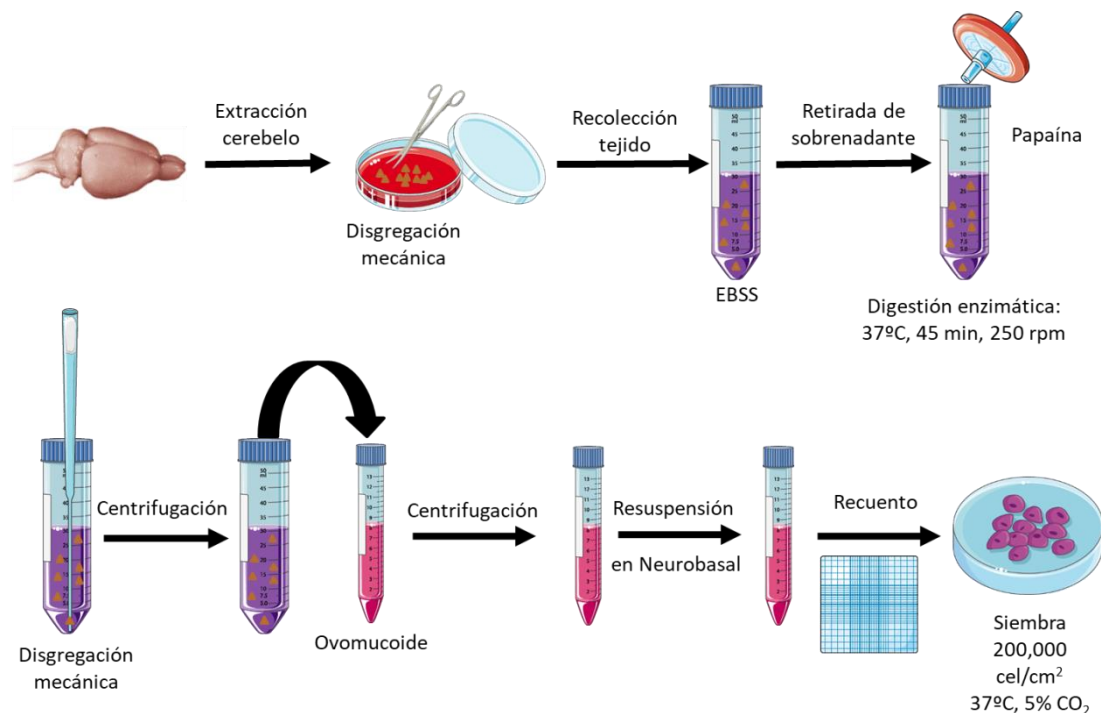
Tabla V. Relación de compuestos y reactivos utilizados.

Categoría y uso	Reactivos	Casa comercial
<b>Cultivo celulares</b>	Neurobasal, suplemento B27 Papaína, ADNsa, Ovomucoide EBSS, Glutamax 100x, AraC, antibióticos/antimicóticos, azul tripán, Poli-D-Lisina	Gibco Worthington Sigma
<b>Experimentos de PCR:</b> <b>Extracción y limpieza de ARN</b>	SpeedTools Total RNA extraction Kit	Biotoools
<b>Geles</b>	Turbo DNA Free Agarosa	Ambion Sigma
<b>RT-PCR</b>	SYBR-Save DNA gel stain	Molecular Probes
<b>PCR</b>	Taqman® RT Reagents	Invitrogen
<b>Q-PCR</b>	DNA Amplitools Master Mix	Biotoools
<b>Inhibidores ARNsas</b>	LuminoCt® Qpcr Ready Mix	Sigma
<b>Marcadores de peso molecular</b>	Rnase-Zap Patrón de ADN (PCR 100 bp Low Ladder)	Sigma Thermo Fischer Scientific
<b>Farmacología:</b> <b>Agonistas y antagonistas purinérgicos</b>	BzATP, A-438079	Sigma/Tocris
<b>Inhibidores de proteínas implicadas en vías de señalización</b>	U-0126, SB202190, GF-I, LY294002, MG132, BCI, Actinomicina D	Calbiochem/Sigma/Tocris
<b>Factores de crecimiento</b>	EGF, BDNF	Peprotech
<b>Ensayos de Viabilidad celular</b>	MTT	Sigma
<b>Inmunotransferencia/ Inmunofluorescencia</b>		
<b>Extracción y cuantificación de proteínas</b>	MOPS, NaF, β-glicerol fosfato, Ortovanadato, EDTA, EGTA, Tritón-X-100, Nonidet-P-40 Complete (inhibidor de proteasas)	Sigma  Roche
	BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio Rad
<b>Electroforesis y transferencia</b>	Persulfato amónico, Bis- acrilamida, TEMED, β- mercaptoetanol, Azul de bromofenol SDS, glicina, Trizma base, BSA, Tween-20 Metanol Membranas PVDF Patrones de proteínas de peso molecular conocido Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	   Sigma Macron GE Healthcare  Thermo Fischer Scientific
<b>Revelado de membranas</b>	Western Lightning ECL Pro	Perkin Elmer
<b>Fijación y bloqueo</b>	Paraformaldehído, Triton-X-100, BSA.	Sigma
<b>Tinción de núcleos</b>	DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)	Thermo Fischer Scientific
<b>Medio de montaje</b>	Fluor Save™ Reagent	Merck-Milipore

## MÉTODOS.

### 4. Obtención y cultivo de neuronas granulares de cerebelo.

Para la realización de los cultivos primarios de neuronas granulares se llevó a cabo la extracción del cerebelo de ratas Wistar de 6-7 días de vida o ratones C57BL/6 ó P2xr7-EGFP de 4-5 días de vida según el método descrito por Meyer-Franke *et al.* (Meyer-Franke *et al.*, 1995), modificado posteriormente por Pons *et al.* (Pons *et al.*, 2001), como se representa en la Figura 17.



**Figura 17. Esquema representativo de un cultivo de neuronas granulares de cerebelo.**

Para cada cultivo se emplearon camadas de entre 6 y 9 ratas Wistar. Estos animales se sacrificaron por decapitación utilizando tijeras estériles. A continuación, los cerebelos se extrajeron con ayuda de unas pinzas de microdisección estériles y se mantuvieron en medio de aislamiento EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*). Posteriormente, los cerebelos se transfirieron a una placa de 35 mm de diámetro, con unas gotas de EBSS para evitar la deshidratación del tejido, para proceder a la eliminación los restos de meninges, materia blanca y vasos sanguíneos con unas pinzas de disección estériles.

Tras este paso se procedió a la disgregación mecánica del tejido con ayuda de unas pinzas y tijeras curvas estériles, troceando los cerebelos en fragmentos de aproximadamente 1 mm de grosor. El tejido disgregado se recogió con una pipeta Pasteur de plástico estéril, transfiriéndolo a un tubo cónico de 50 mL, completando con medio de aislamiento hasta un volumen de unos 5-10 mL. Tras este paso se dejaron sedimentar los fragmentos de tejido durante uno o dos minutos, para después retirar el medio sobrante. Después se filtraron sobre los fragmentos de cerebelo 10 mL de EBSS conteniendo DNAsa 100 U/mL, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, cisteína 5 mM, EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) 2 mM y 65,6 unidades (UI) de papaína, previamente activada por incubación de la solución en una atmósfera a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos.

El tubo, herméticamente cerrado, se mantuvo en agitación orbital durante 45 min a 37°C y 250 revoluciones por minuto (r.p.m.) para que se produjera correctamente la digestión enzimática del tejido por medio de la papaína. Una vez concluida la incubación, se paró la digestión enzimática mediante la adición de 300 µL de Ovomucoide 15,4 mg/mL (inhibidor de la papaína) y se procedió a la homogeneización del tejido con una pipeta Pasteur de vidrio previamente esterilizada, y siliconizada.

Tras este paso se dejó reposar el contenido del tubo durante unos minutos a fin de sedimentar los fragmentos de tejido no disgregado, para después recoger el sobrenadante y centrifugarlo durante 5 minutos a 220 x g. A continuación, se retiró el sobrenadante obtenido de la centrifugación y el precipitado, tras ser resuspendido en 3 mL de EBBS, se añadió lentamente y con movimientos circulares por la pared de un tubo cónico que contenía ovomucoide, previamente agitado para formar un gradiente de espuma. Después de esto se centrifugó a 180 x g durante 5 min y el precipitado se resuspendió finalmente en 5-10 mL de medio Neurobasal.

Una vez resuspendido se procedió a realizar el recuento del número de células vivas obtenidas en una cámara de Neubauer, utilizando como colorante vital el Azul de Tripán. Para ello se diluyeron 20 µL de la suspensión celular en 180 µL de medio Neurobasal (dilución 1:10). Posteriormente se mezclaron 50 µL de esta solución con 50 µL de Azul de Tripán (1:1 v/v) y se llevó a la cámara de Neubauer para el recuento bajo microscopio óptico. Se consideraron como células viables las células capaces de excluir el colorante. El número de células por mL se estimó según la relación:

**Nº células/mL = nº células contadas x 10<sup>4</sup> x factor de dilución**

Tras el recuento las células se resuspendieron en medio Neurobasal (Gibco®) suplementado con B-27 (Gibco®) al 2% (v/v), KCl 20 mM, glutamina 0,5 mM y solución antibiótica/antimicótica 100X, que contiene penicilina 100U/mL, estreptomycin 0,1 mg/mL y anfotericina 0,25 µg/mL, hasta obtener la densidad celular deseada. Las células se sembraron a una concentración de 200.000 células/cm<sup>2</sup> sobre placas Petri y/o multipocillo de plástico estériles, o en cubreobjetos de vidrio de 15 mm de diámetro y 0,15 mm de grosor.

Tanto las placas como los cubreobjetos habían sido previamente tratados con una solución de Poli-D-Lisina (Sigma) (0,1 mg/mL en agua desionizada estéril) durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua desionizada estéril para eliminar los restos de Poli-D-Lisina, y se dejaron secar en el interior de la campana de flujo laminar.

Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a temperatura de 37°C, con atmósfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub> y saturada de humedad. A las 24 horas de la siembra de las células se realizó un cambio de medio, en el que se retiraron 2/3 del volumen del medio y se sustituyeron por el mismo volumen de Neurobasal completo fresco al que se añadió el antimitótico AraC (Citosina-β-D-Arabinofuranósido) a una concentración de 10 µM en el volumen final de medio. Este antimitótico evita la proliferación de células de origen glial en el cultivo. Bajo estas condiciones, se obtuvo un porcentaje de neuronas granulares superior al 95% sobre la población total en todos los cultivos.

## 5. Tratamiento de los cultivos de neuronas granulares de cerebelo.

Los experimentos se realizaron con neuronas mantenidas en cultivo 7-10 DIV (Días *in vitro*), llevándose a cabo las incubaciones de los distintos tratamientos en el medio de cultivo completo. Los agonistas BzATP (300  $\mu$ M), EGF (100 ng/mL) y BDNF (50 ng/mL) se añadieron directamente al medio de cultivo. Cuando se emplearon antagonistas o inhibidores de las rutas de señalización, fueron añadidos 30 minutos antes de los agonistas. Finalizado el tiempo de incubación con los agonistas, se recogieron los lisados celulares, bien para la obtención de proteínas o de ARN.

## 6. Estudios de expresión génica.

### 6.1. Obtención de las muestras.

Los experimentos de reacción de la transcriptasa inversa (RT-PCR) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR) se realizaron a partir del ARN obtenido de cultivos de neuronas granulares mantenidos durante 8-10 DIV o a distintos DIV. Para la obtención del material genético del cultivo se emplearon raspadores celulares estériles con el fin de extraer y homogeneizar el material celular de placas Petri de 60 mm de diámetro a una densidad de  $6 \times 10^6$  células/placa en 350  $\mu$ L de tampón desnaturalizante (conteniendo isotiocianato de guanidina y  $\beta$ -mercaptoetanol 10  $\mu$ L/mL). La manipulación del ARN tuvo lugar en todo momento en condiciones libres de RNasas. El procedimiento de extracción de ARN se realizó con un kit cuyo fundamento está basado en la capacidad de unión del ARN a una columna de gel de sílice en presencia de una elevada concentración de sales (SpeedTools Total RNA Extraction Kit, Biotools).

Las muestras una vez disgregadas, se agitaron en vórtex durante 1 minuto cada una a fin de disminuir su viscosidad y homogeneizar el material obtenido. A continuación, se añadió un volumen igual al que había en el tubo (350  $\mu$ L) de etanol al 70%, para propiciar las condiciones óptimas de unión. Las muestras se centrifugaron a  $11.000 \times g$  en distintas columnas que contenían una membrana de sílica gel a las que se unen por adsorción las moléculas de ARN de tamaño superior a 200 nucleótidos, quedando los ARN 5,8S, 5S y de transferencia en el eluido.

Después de cada extracción y de forma rutinaria las muestras de ARN se trataron con ADNasa durante 30 minutos a 37°C de acuerdo con las instrucciones del kit Turbo DNA free (Ambion) para eliminar la posible contaminación del ARN con ADN genómico. A continuación, se añadió el reactivo de inactivación de ADNasa y se centrifugó 1,5 minutos a  $10.000 \times g$ , recogándose el sobrenadante que contenía el ARN.

### 6.2. Determinación de la concentración y grado de pureza del ARN extraído.

La concentración de ARN en las muestras extraídas se determinó midiendo los valores de absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro a 260 nm con la ayuda del dispositivo NanoDrop que nos permite medir directamente la concentración de ARN utilizando muy poco volumen de la muestra.

El grado de pureza del material extraído se estimó a partir del cociente entre la Absorbancia de la muestra medida a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) el cual, para una disolución de ARN puro, debe tener un valor igual o muy próximo a 2. En caso de no ser así, el programa del Nanodrop realiza una corrección automática de la concentración de ARN, consiguiendo gran precisión en las medidas de concentración de ARN.

### 6.3. Reacción de la transcriptasa reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para llevar a cabo la retrotranscripción de ARN en primer lugar se preparó una premezcla consistente en 6  $\mu\text{L}$  de Random Primers a una concentración de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , el volumen correspondiente a 1  $\mu\text{g}$  de ARN de cada una de las muestras en el tubo correspondiente, y se completó hasta 76  $\mu\text{L}$  con agua libre de nucleasas. Estos tubos se mantuvieron durante 10 minutos a temperatura ambiente, para después añadir 39  $\mu\text{L}$  de una premezcla que contiene:

- **Buffer M-MLV RT 5X:** 23  $\mu\text{L}$ /tubo
- **DTT 0,1 M:** 4  $\mu\text{L}$ /tubo
- **dNTPs 10 mM:** 4  $\mu\text{L}$ /tubo
- **RNAse OUT 40 U/ $\mu\text{L}$ :** 1  $\mu\text{L}$ /tubo (40 U)
- **M-MLV RT 200 U/ $\mu\text{L}$ :** 2  $\mu\text{L}$ /tubo (400 U)
- **H<sub>2</sub>O nuclease-free:** 5  $\mu\text{L}$ /tubo

La reacción de retrotranscripción tuvo lugar durante 90 minutos a 37°C en termobloque u horno de hibridación. La reacción se detuvo subiendo la temperatura hasta 70°C durante 15 minutos a fin de inactivar la enzima retrotranscriptasa. El ADNc se guardó a -80°C.

A fin de comprobar que la reacción de retrotranscripción había transcurrido correctamente y para disponer de una muestra de número de copias conocidas de los genes de interés para realizar la recta patrón para la PCR cuantitativa, se llevó a cabo una reacción de PCR con las muestras obtenidas de la retrotranscripción. Para la realización de estas PCR se empleó la ADN AmpliTools Master Mix 2x de Biotools, cebadores forward y reverse a una concentración final de 0,9  $\mu\text{M}$  del gen a amplificar (*Dusp6*, *Dusp1* o *Gapdh*) y agua libre de nucleasas.

La reacción de amplificación se inició incubando la mezcla a 95°C durante 10 minutos para la activación de la ADN polimerasa y, a continuación, se repitieron 40 ciclos en las condiciones de desnaturalización, alineamiento de los cebadores y elongación (95°C, 60 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 45 segundos, respectivamente). Una vez completado el número total de ciclos, se realizó un paso de elongación final manteniendo la mezcla durante 7 minutos a 72°C.

Cada reacción de PCR se realizó en paralelo con un control sin ADNc molde. Además, para cada muestra de ARN se realizó una reacción de RT en la que no se añadió la transcriptasa inversa, para comprobar si existía contaminación con ADN genómico en la muestra, garantizando que los fragmentos amplificados en cada reacción correspondían a secuencias del ARNm presente en las células.

Tanto la reacción de retrotranscripción como la de amplificación por PCR a tiempo final se llevaron a cabo en el termociclador GeneAmp 2400 de Applied Biosystems.

La separación e identificación de los productos resultantes de la amplificación se realizó en geles de agarosa al 1,8%, teñidos con SYBR Safe (Molecular Probes). Para identificar el número de pares de bases de los genes amplificados se utilizó el patrón de ADN comercial PCR 100 bp Low ladder. Los fragmentos de ADN amplificados se



visualizaron mediante el sistema de captación de imágenes Gel Logic 200 Imagen System con luz ultravioleta.

#### **6.4. Amplificación por PCR a tiempo real (PCR cuantitativa en tiempo real, QPCR).**

Mediante este método hemos podido hacer el seguimiento del proceso de amplificación del ADN complementario durante el desarrollo de la reacción de la PCR. El uso de esta técnica para cuantificar el material genético de una muestra está basado en la relación directa que existe entre la cantidad de ADN molde inicial y el producto que se amplifica a partir del mismo. De esta forma, cuanto mayor sea la cantidad de ADN complementario de partida, más temprana será la aparición del producto amplificado.

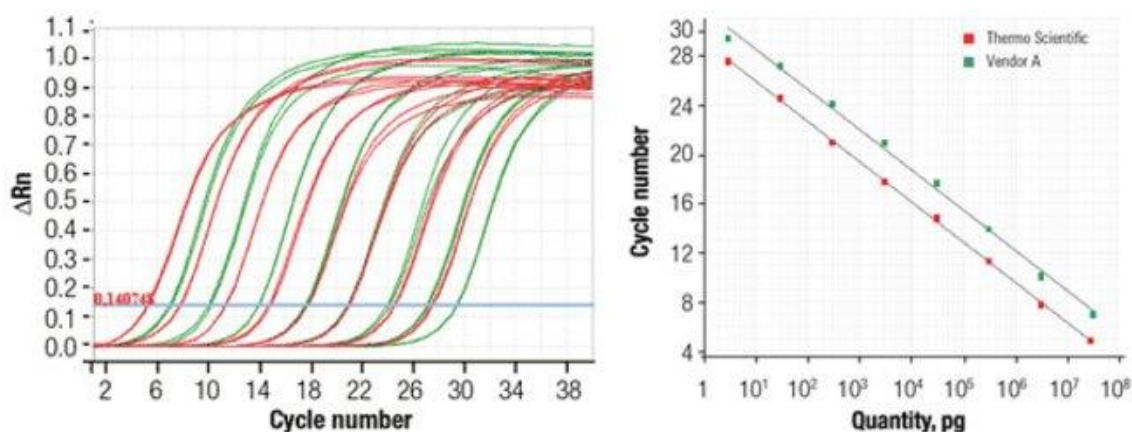
Las reacciones de RT-PCR cuantitativa se realizaron usando el sistema StepOne Plus Real Time PCR de Applied Biosystems empleando el kit de amplificación LuminoCt® Qpcr Ready Mix™ de Sigma. Se utilizaron sondas fluorescentes de Roche marcadas con el fluoróforo FAM en el extremo 5' y en el 3' con NFQ-MGB. Las sondas para *Dusp1*, *Dusp6* y *Gapdh* se diseñaron a partir de la base de datos de las librerías Universal ProbeLibrary de Roche que son los que se muestran en la Tabla VI.

**Tabla VI. Secuencias de las parejas de oligonucleótidos cebadores empleados en la amplificación.**

<b>Gen</b>	<b>Secuencia F (5'-3')</b>	<b>Secuencia R (5'-3')</b>	<b>Sonda</b>	<b>Amplicon</b>
<b><i>Dusp1</i></b>	GTGCCTGACAGTGCA GAATC	CCAGGTACAGGAAG GACAGG	89	94 nt
<b><i>Dusp6</i></b>	TCTCTGATCACTGGA GCCAAA	TTTTTGCCTCGGGC TTC	123	80 nt
<b><i>Gapdh</i></b>	CCCCTCTGGAAAGCT GTG	GGATGCAGGGATGA TGTTCT	43	61 nt

El ensayo de amplificación se llevó a cabo en placas multipocillo en un volumen final de 25 µL, conteniendo 12,5 µL de la mezcla LuminoCt® Qpcr Ready Mix™ (incluye los dNTPS, tampón de reacción y Jumpstar Taq ADN polimerasa), 1,25 µL de cada cebador y sonda correspondiente, 2,5 µL de ARNt (30 ng/mL), 0,25 µL de colorante de referencia pasiva (ROX), 1 µL de agua ultrapura estéril, y 5 µL del ADNc obtenido tras las RT. La reacción se desarrolló en 20 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94°C y de hibridación de 30 segundos a 60°C.

La cuantificación de los genes se realizó mediante interpolación de los datos en una recta patrón. Para la realización de la recta patrón hicimos diluciones seriadas de un producto amplificado por una PCR clásica que suponemos posee alrededor de  $10^{14}$  copias del fragmento de estudio. En la curva patrón se representa el logaritmo del número de copias obtenido de cada dilución del gen de interés frente al valor de número de ciclos (Kasler *et al.*, 2000) obtenido tras la amplificación. Siempre se trabajó con curvas patrones cuyos coeficientes de correlación eran mayores de 0,98 y que daban una eficiencia de amplificación cercana al 100% para todos los genes. Como control interno de la cantidad total de ADNc añadida se utilizó el gen de expresión constitutiva GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Finalmente, los resultados se expresaron como aumento o disminución de la expresión con respecto a la condición control, en ausencia de estimulación (Figura 18).



**Figura 18. Modelo de curva patrón obtenida en PCR cuantitativa real.** En la imagen izquierda se muestran las curvas de amplificación obtenidas tras la PCR para cada condición. Los valores de Ct se obtienen del corte de las curvas con la línea que marca el umbral de detección o threshold. En la imagen derecha se representa el logaritmo del número de copias obtenido de cada dilución del gen de interés con el valor de Ct obtenido tras la amplificación, para obtener la curva patrón de cada gen.

## 7. Inmunotransferencia.

### 7.1. Extracción de proteínas totales.

Para la extracción de proteínas totales se utilizaron neuronas granulares de cerebelo que habían sido previamente sembradas en placas de 60 mm de diámetro a una concentración de aproximadamente  $6 \times 10^6$  células por placa, unas 200.000 células/cm<sup>2</sup>. Estas neuronas se mantuvieron entre 8 y 10 días en cultivo. Una vez transcurridos los distintos días *in vitro* de cultivo, se realizaron las estimulaciones correspondientes y se retiró el medio de cultivo completamente y se añadieron 180  $\mu$ L de tampón de lisis frío, cuya composición es la siguiente: MOPS (ácido Morfolino-Propano-Sulfónico) 20 mM, NaF 50 mM,  $\mu$ -glicerolfosfato 40 mM, ortovanadato 1mM, EDTA 5 mM, EGTA (Ácido Etilenglicol-bis(2-Aminoetiléter)-N,N,N',N'-Tetraacético) 2 mM, 0,5% (v/v) Triton X-100, los inhibidores de proteasas (Cocktail Complete de inhibidores de proteasas de la casa comercial Roche) y 0,2 mg/ml de PMSF (Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo).

Las células se rasparon en frío en este tampón utilizando raspadores celulares estériles y el lisado obtenido se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a  $16.100 \times g$  durante 10 minutos a 4°C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante, donde se encontraban las proteínas totales solubilizadas y se congeló a -20°C para su posterior utilización.

### 7.2. Extracción de fracciones subcelulares.

Para la obtención de extractos de proteínas nucleares y citosólicas, las neuronas granulares sembradas en placas de 6 mm de diámetro a una densidad de 200.000 células/cm<sup>2</sup>, (se emplearon 2 placas para cada condición,  $12-15 \times 10^6$  células) se lavaron con PBS (Tampón Salino de Fosfato) frío y se rasparon en 1 mL de este mismo medio. Los extractos recogidos de esta forma, se centrifugaron a  $500 \times g$  durante 1 minuto a 4°C. El precipitado resultante se resuspendió en 300  $\mu$ L de tampón de lisis cuya composición es la siguiente (2/3 del volumen de PBS, Nonidet P-40 1% (v/v), Ortovanadato Sódico 1mM, NaF 50 mM, EDTA 0,5 M, glicerol 10% (v/v), DTT (Ditiotreitol) 1mM, PMSF 0,2 mg/mL y Cocktail Complete Roche 1x).

Una vez resuspendido se realizó una nueva centrifugación a  $4.000 \times g$  durante 1 minuto a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se guardó como fracción citosólica mientras que el precipitado, compuesto por la fracción nuclear se solubilizó en  $58,5 \mu\text{L}$  de tampón de lisis al que se añadieron  $1,5 \mu\text{L}$  de SDS (Dodecil Sulfato Sódico) 20% (v/v). Una vez resuspendida la fracción nuclear se llevó a un volumen de  $300 \mu\text{L}$  con tampón de lisis y se almacenó convenientemente para su posterior utilización guardando una alícuota de ambas fracciones para la cuantificación de proteínas.

### **7.3. Cuantificación de proteínas.**

La cuantificación de la concentración de proteínas presente en los extractos totales se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se trata de un ensayo colorimétrico basado en el cambio de absorbancia del tinte Azul Brillante de Coomasie G-250. Este tinte se encuentra en 3 formas: aniónica (azul), neutra (verde) y catiónica (rojo-pardo). Bajo condiciones ácidas la forma roja del colorante se convierte en azul, pudiendo unirse a las proteínas del ensayo. En caso de no existir proteína a la que unirse, el colorante se mantiene de color rojo-pardo. Este reactivo forma complejos fuertes no covalentes con el grupo carboxilo de las proteínas mediante fuerzas de Van der Waals y con el grupo amino mediante interacciones electrostáticas. Durante la formación de estos complejos, la forma roja-parda de Coomasie es capaz de donar su electrón libre a los grupos ionizables de la proteína, causando una alteración en la conformación nativa de la proteína, quedando expuestos los bolsillos hidrofóbicos. Estos bolsillos en la estructura terciaria de la proteína se unen de manera no covalente a la región no polar del colorante a través de fuerzas de Van der Waals, aproximándose los grupos amino con carga positiva a la carga negativa del tinte, estabilizándose así la forma azul del reactivo de Coomasie.

Este cambio en la coloración se manifiesta en un cambio en la longitud de onda de la absorbancia del colorante, pasando de obtener un pico máximo de absorbancia a  $465 \text{ nm}$  cuando está en su forma no unida o catiónica (rojo-pardo) a una absorbancia máxima a  $595 \text{ nm}$  cuando está en su forma unida o aniónica (azul). El incremento de absorbancia a  $595 \text{ nm}$  se correlaciona linealmente con el incremento de la concentración de proteína en la muestra.

Como proteína patrón se utilizó la BSA (albúmina de suero bovino), realizándose una recta patrón con los valores de absorbancia a  $595 \text{ nm}$  de esta proteína para diferentes diluciones conteniendo entre 0 y  $25 \mu\text{g/mL}$  de BSA. Para calcular la concentración de proteínas se añadieron  $5 \mu\text{L}$  de cada una de las muestras a  $1 \text{ mL}$  de Reactivo de Bradford (BioRad) diluido 5 veces. Se midió la absorbancia a  $595 \text{ nm}$  de la mezcla en el espectrofotómetro y se obtuvieron los valores de concentración de proteínas interpolando los resultados en la recta patrón.

Una vez conocidas las concentraciones de proteínas presentes en cada una de nuestras muestras se realizaron los cálculos necesarios para cargar la misma cantidad de proteína en cada uno de los pocillos del gel de electroforesis ( $25 - 30 \mu\text{g}$  de proteína por pocillo).

#### 7.4. Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de membranas.

Como primer paso se mezclaron tres volúmenes de los extractos de proteínas solubilizadas con un volumen de tampón de carga concentrado 4 veces y cuya composición es la siguiente: glicerol al 50% (v/v), Tris-ácido clorhídrico (Tris-HCl) 125 mM pH 6,8, SDS al 20% (p/v), azul de bromofenol al 8% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% (v/v) (éste último añadido justo en el momento de utilización). Una vez mezcladas, las muestras se llevaron a ebullición a 100°C durante 5 minutos en un termobloque, a fin de desnaturalizar completamente el extracto proteico de la muestra. Estas muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 8%, 10% ó 12% (p/v) de diez o quince pocillos, en función del número de muestras y el tipo de proteína que se pretendía revelar. La electroforesis se llevó a cabo utilizando un sistema mini-Protean de Bio-Rad, durante aproximadamente 120 minutos a un voltaje inicial de 90 voltios durante unos 20 minutos, hasta que el frente atravesara el gel concentrante y, posteriormente, a 120 voltios hasta que el frente alcanzase el final del gel. Todo este proceso se llevó a cabo a 4°C, empleándose un tampón de electroforesis cuya composición es la siguiente: Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,1%, a un pH aproximado de 8,3.

Una vez concluida la electroforesis los geles se equilibraron en tampón de transferencia durante 5 minutos. La composición del tampón de transferencia es la siguiente: glicina 192 mM, Tris 25 mM y de metanol al 20% (v/v), a un pH aproximado de 8,3. Del mismo modo se hidrataron y equilibraron las membranas de fluoruro de polivinilideno (PDVF) a las que se iban a transferir las proteínas de los geles. Para ello se introdujeron estas membranas durante 30 segundos en metanol, seguidos de 5 minutos en agua destilada y 30 minutos en tampón de transferencia. La transferencia de proteínas se llevó a cabo empleando un sistema mini-Trans Blot de Bio-Rad, a una intensidad de 240 mA durante 80 minutos a 4°C.

Una vez transferidas las proteínas a las membranas de PDVF, éstas se bloquearon con una solución preparada para tal efecto, con TBS (Tampón Salino de Trizma Base) compuesto de Tris 10 mM, NaCl 100 mM a un pH de 7,5. Además, la solución de bloqueo contenía Tween-20 al 0,1% (v/v) y 5% p/v de leche desnatada deshidratada o 3% (p/v) de BSA, durante una hora a temperatura ambiente en un agitador orbital. Una vez concluido el bloqueo las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes en tampón TBS-Tween-20 al 0,1% v/v con leche desnatada deshidratada al 5% (p/v) o BSA al 3% (p/v) durante toda la noche a 4°C. La relación de los anticuerpos empleados y las concentraciones utilizadas pueden verse en la Tabla VII.

Tras este paso, el exceso de anticuerpo se eliminó mediante lavados con tampón TBS-Tween al 0,1% (v/v) y se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (anti-IgG HRP de ratón, conejo o cabra, en función del anticuerpo primario utilizado) (Tabla VII). Esta incubación se llevó a cabo en tampón TBS-Tween 0,1% v/v con leche al 5% (p/v) o BSA al 3% (p/v), a temperatura ambiente en agitador orbital durante al menos una hora. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante 3 lavados empleando tampón TBS-Tween 0,1% v/v y el revelado se llevó a cabo incubando la membrana durante 5 minutos con el kit Western Lightning ECL Pro (Perkin Elmer).

Este sistema se basa en la oxidación del reactivo luminol del kit por parte de la peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario, generando la emisión de luz que puede ser detectada por las películas radiográficas o sistemas de imagen. En este trabajo se

empleó un sistema de imagen denominado LAS 500 Images. Para determinar la intensidad de marcaje de los anticuerpos y cuantificar las cantidades relativas de proteína de cada una de las muestras se empleó el programa Image Quant.

**Tabla VII. Anticuerpos primarios, secundarios y diluciones empleadas en los experimentos de inmunotransferencia.** Todos los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Peroxidasa de Rábano Picante) son de la casa comercial Dako Cytomation.

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Anti-pERK1/2 (E4)</b>	1:1000	Anti IgG-ratón-HRP (conejo)	1:4000	Santa Cruz Biotechnology
<b>Anti-pp38 (Thr180/Tyr182)</b>	1:2000	Anti IgG-conejo-HRP (cabra)	1:1000	Cell Signalling
<b>Anti-DUSP6/MKP3 (EPR129Y)</b>	1:500	Anti IgG-conejo-HRP (cabra)	1:1000	Abcam
<b>Anti-pDUSP6 (Ser197)</b>	1:500	Anti IgG-conejo-HRP (cabra)	1:1000	SAB
<b>Anti-DUSP1/MKP1 (C19)</b>	1:500	Anti IgG-conejo-HRP (cabra)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
<b>Anti-pDUSP1 (Ser323)</b>	1:500	Anti IgG-conejo-HRP (cabra)	1:1000	SAB
<b>Anti-pDUSP1 (Ser359)</b>	1:1000	Anti IgG-conejo-HRP (cabra)	1:1000	Cell Signalling
<b>Anti-<math>\beta</math>-III Tubulina</b>	1:10.000	Anti IgG-ratón-HRP (conejo)	1:5000	Sigma
<b>Anti-GAPDH</b>	1:10.000	Anti IgG-conejo-HRP (cabra)	1:1000	Sigma
<b>Anti-GFP</b>	1:1000	Anti IgG-conejo-HRP (cabra)	1:1000	Sigma
<b>Anti-H2B</b>	1:1000	Anti IgG-ratón-HRP (conejo)	1:1000	Cell Signalling



## 8. Inmunocitofluorescencia.

Para los estudios de inmunocitofluorescencia se emplearon neuronas mantenidas en cultivo durante 7-10 DIV sembradas en cubreobjetos de 15 mm, en placas de 35 mm (200.000 células/cubreobjetos). Tras realizar las estimulaciones oportunas, se retiró el medio de estimulación, y los cubreobjetos se lavaron en PBS durante 5 minutos, para seguidamente, ser fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS a pH 7,2 durante 15 minutos. Después del fijado se lavaron tres veces más con PBS y se incubaron en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo empleada estaba compuesta por PBS al que se le había añadido BSA al 3%, Tritón X-100 al 0,1%. Tras el bloqueo se llevaron a cabo 3 lavados de 5 minutos con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. A continuación, se realizaron tres lavados en PBS, para eliminar el exceso de anticuerpo primario. El marcaje se reveló incubando las preparaciones con los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos (FITC, Cy3 ó Cy5, Cianina tipo 3 ó 5) durante al menos una hora a temperatura ambiente. Posteriormente a la incubación se realizaron tres lavados con PBS. En los casos en que los núcleos celulares fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración 1  $\mu$ M, éste se añadió tras el segundo lavado y se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente, lavándose después los cubreobjetos con PBS para su eliminación. Por último, se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos utilizando como medio de montaje el Fluor Save™ Reagent de Merck-Millipore, que reduce el apagamiento de los fluorocromos. Tras dejar secar el medio de montaje, los portaobjetos se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su estudio.

Las imágenes de inmunofluorescencia se tomaron en el microscopio confocal de Leica modelo TCS SPE, controlado con el software Leica LAS AF versión 2.5.1.5757. El procesamiento posterior de las imágenes adquiridas se realizó con el programa Image J.

Los anticuerpos primarios empleados para inmunocitofluorescencia fueron los mismos que los que empleamos para Western Blot, pero en este caso se utilizaron a una concentración 1:100. Los anticuerpos secundarios empleados fueron: anti-IgG de ratón Alexa488 (cabra, 1:200), anti-IgG de ratón FITC (Fluoresceína) (1:200), anti-IgG de conejo Alexa 488 (cabra, 1:400), anti-IgG de ratón Cy3 (burro, 1:400) y anti-IgG de conejo Cy3 (burro, 1:400). Los Alexa 488 son de Thermo Fischer Scientific, mientras que Cy3 y FITC son de la casa comercial Jackson ImmunoResearch Laboratorios Inc.

## 9. Ensayo de viabilidad celular basado en el metabolismo del MTT.

Este método se basa en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales de romper el anillo de tetrazolio del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio, que en disolución es de color amarillo, formando cristales insolubles de formazán, de color morado, cuando se reduce. Estos cristales de formazán pueden ser solubilizados en isopropanol y medirse su Absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Cuanto mayor sea el número de células vivas presentes, mayor cantidad de cristales de formazán se formarán y mayor será la absorbancia de la muestra.

Para este ensayo se emplearon neuronas granulares de cerebelo que habían sido sembradas en placas de 24 pocillos previamente tratadas con Poli-D-Lisina, como explicamos previamente.

Tras la incubación de las células con los estímulos tóxicos, se les retiró completamente el medio y se le añadió tampón Locke (NaCl 140 mM, KCl 4,7 mM, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, HEPES 10 mM, glucosa 5,5 mM a pH 7,4) al que se le había añadido solución reconstituída de MTT a una concentración de 0,5 mg/mL, manteniéndose en incubación a 37°C durante 2-3 horas. Tras este paso se añadió tampón de solubilización (Triton X-100 al 10%, HCl 1 N al 10%, isopropanol al 80%) en un volumen igual al que teníamos en el pocillo, agitando la placa durante 30-60 minutos, en agitador orbital a temperatura ambiente, hasta que el formazán se solubilizó completamente.

Como último paso se rasparon los pocillos para homogeneizar toda la mezcla y se midió la longitud de onda a 570 nm con ayuda de un espectrofotómetro. Como blanco se empleó una solución de MTT reconstituido en ausencia de células y mezclado con el tampón de solubilización. Los datos de absorbancia obtenidos de las muestras control, que no habían sido sometidas a ningún tratamiento, se ajustaron como referencia al 100% de supervivencia, calculando así, el porcentaje de viabilidad de las células presentes en los pocillos a los que se les habían añadido los diferentes tratamientos.

## **10. Silenciamiento génico de las fosfatasa DUSPs.**

### **10.1 Preparación de bacterias competentes.**

Para la preparación de bacterias competentes en las que poder producir plásmidos se realizó en primer lugar la siembra de la cepa no patogénica *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Las bacterias se mantuvieron durante toda una noche en 5 ml de LB (*Luria-Bertani Broth*) (Triptona 10 g/L, extracto de Levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L), para promover su crecimiento. A la mañana siguiente se emplearon 500  $\mu$ L del medio de cultivo para inocular en 50 mL de LB. El crecimiento del cultivo debe llevarse a cabo a 37°C a 180-200 r.p.m. hasta que la densidad óptica alcance valores de 0,3-0,6. A continuación, se centrifugaron a 1.000 x g, durante 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió cuidadosamente en 5 mL de TSB frío (Triptona 17 g/l, extracto de soja 3 g/l, NaCl 5 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/l). Las células se mantuvieron durante 10 minutos en hielo, antes de hacer alícuotas de 250-300  $\mu$ L y almacenar a -80°C.

### **10.2 Transformación de bacterias y extracción de plásmidos.**

La transformación se realizó según el protocolo descrito por Chung and Miller, 1988 (Chung y Miller, 1988) modificada por Walhout *et al.*, 2003 (Walhout *et al.*, 2003)

Para la transformación de células competentes se utilizó una mezcla de 70  $\mu$ L de agua, 10  $\mu$ L de tampón de ligación, 20  $\mu$ L de KCM 5x (KCl 0,5 M, CaCl<sub>2</sub> 0,15 M, MgCl<sub>2</sub> 0,25 M) a 4°C, a la que se le añadieron 100  $\mu$ L de bacterias competentes y se realizó una transformación por choque térmico. Posteriormente se inocularon en LB y se incubaron durante 45 minutos a 37°C con agitación para, a continuación, sembrarlos en placas Petri con LB-agarosa con el antibiótico correspondiente para realizar la presión selectiva de aquellas colonias que hubiesen incorporado el plásmido. Tras este paso, se seleccionó una colonia y se inoculó en LB líquido para proceder a su crecimiento, y posteriormente extraer el plásmido por lisis y centrifugación según el protocolo descrito por el kit de extracción de plásmidos Qiagen Plasmid Maxi Kit.

### 10.3 Transfección de células.

Las transfecciones de las neuronas granulares de cerebelo de ratón se realizaron con células sembradas en placas multipocillo de 24 pocillos a 1 DIV. En cada pocillo se había dispuesto previamente un cubreobjetos redondo tratado con Poli-D-Lisina. Las células se sembraron a una densidad de 150.000 células/mL por pocillo. Antes de realizar la transfección se retiraron 600  $\mu$ L de medio de cada pocillo y se guardó en un tubo cónico. Para la preparación del medio de transfección se mezclaron 50  $\mu$ L de DMEM con 1  $\mu$ L de Lipofectamina por pocillo y se dejó reposar durante 5 minutos. Mientras tanto se prepararon los correspondientes plásmidos a una concentración de 0,5  $\mu$ g/mL en DMEM para añadir una cantidad de 50  $\mu$ L por pocillo. A continuación, se mezclaron el medio con Lipofectamina con el medio con el plásmido a partes iguales, y se dejó reposar durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ L de la mezcla de DMEM, Lipofectamina y plásmido a cada pocillo y se dejó durante 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo se retiró el medio de transfección y se añadieron 500  $\mu$ L del medio original de cultivo que se había retirado anteriormente. Los tratamientos se hicieron como se indica en los pies de figura, para posteriormente fijar las células y realizar la inmunocitofluorescencia.

La longitud de las prolongaciones celulares, así como su número se analizaron empleando el programa Neuron J, una extensión del programa Image J que permite medir las prolongaciones neuronales de manera semiautomática.

### 11. Análisis estadístico de los datos.

Los datos obtenidos se presentan, en general, como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Todos los resultados mostrados en este trabajo corresponden a un mínimo de tres experimentos realizados en duplicado con diferentes cultivos. Las comparaciones entre medias se realizaron con un análisis de la varianza (Vulchanova *et al.*, 1996) salvo los experimentos sobre las medidas de longitud y número de las prolongaciones neuronales, en los que se realizó un análisis Two-Way ANOVA. Los niveles de significación establecidos han sido: \*\*\*\* $p < 0,0001$  diferencia extremadamente significativa (\*\*\*\*),  $p < 0,001$ , diferencia extremadamente significativa (\*\*\*);  $p < 0,01$ , diferencia muy significativa (\*\*);  $p < 0,05$ , diferencia significativa (\*). Los niveles superiores a 0,05 se han tomado como no significativos. Para un análisis posterior a la obtención de un valor de significancia inferior a 0,05, se utilizó el post-test de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, o bien, el test de Dunnet para comparaciones con respecto al control.



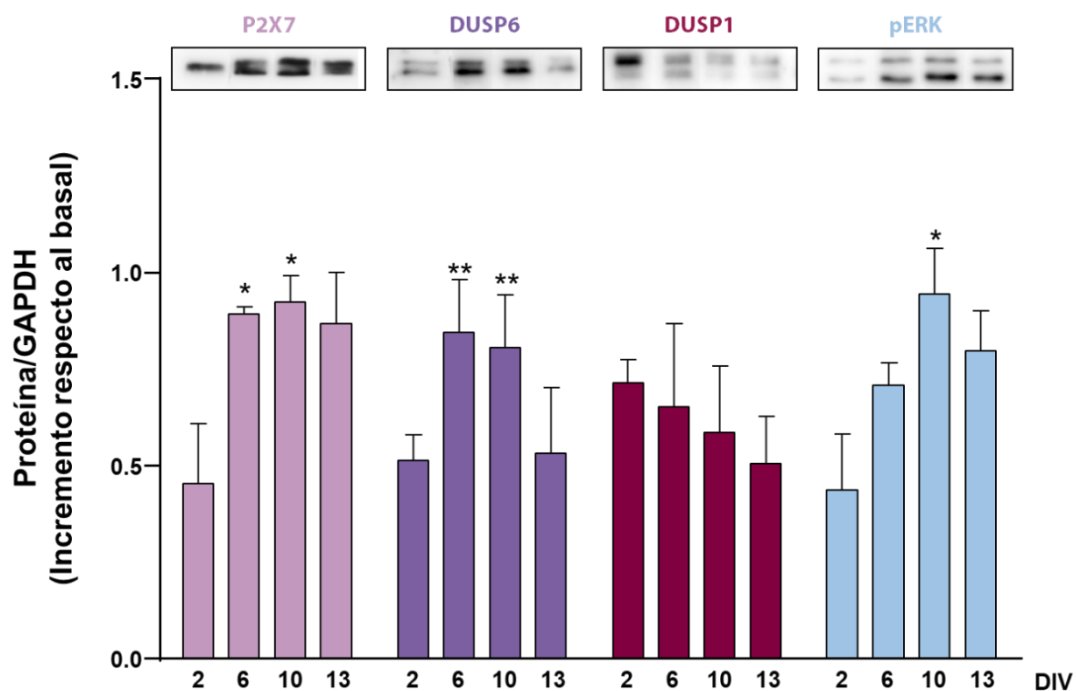


## ***RESULTADOS***



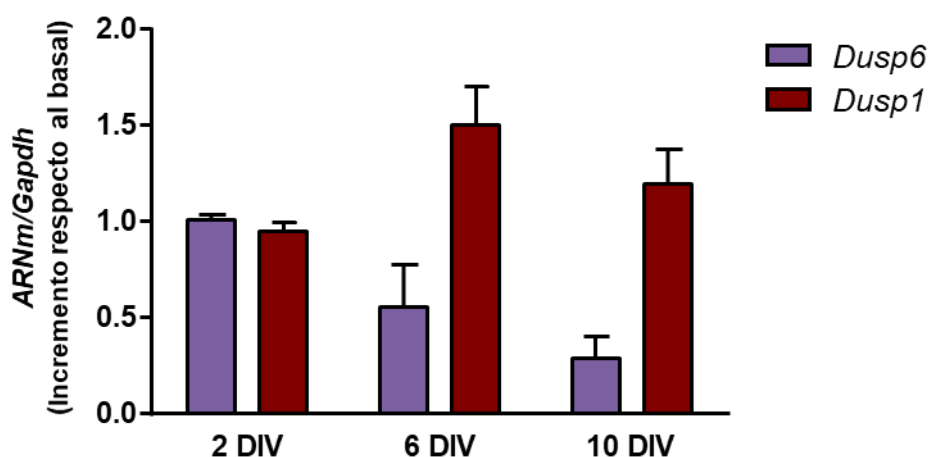
## 1. Evolución de los niveles de fosfatasa de especificidad dual y del receptor P2X7 durante el desarrollo de las neuronas granulares en cultivo.

En primer lugar, se decidió analizar los niveles de expresión de las proteínas fosfatasa DUSPs y del receptor P2X7 a los diferentes días de cultivo *in vitro* de las neuronas granulares. El seguimiento se realizó mediante experimentos de Western Blot. Se comprobó que, tanto la fosfatasa DUSP1 como DUSP6 sufrían variaciones en sus niveles de expresión a lo largo del cultivo, sin embargo, sus patrones eran diferentes. Los máximos niveles de expresión de DUSP6 se producían en torno a 6-10 DIV de cultivo coincidiendo con los del receptor P2X7, que aún mantenía niveles elevados a tiempos más avanzados, cuando el cultivo se encuentra prácticamente diferenciado, a 10-13 DIV. Estos resultados se correspondían también con un incremento de los niveles de fosforilación de ERK1,2, indicando que estas proteínas podrían estar implicadas en el proceso de diferenciación y maduración de las neuronas granulares. En cambio, los niveles de DUSP1 disminuyeron gradualmente a medida que el cultivo iba madurando, revelando que, para las neuronas granulares, puede ser clave presentar unos niveles máximos de expresión de DUSP1 en la etapa inicial de la diferenciación, en torno a 2-4 DIV. Teniendo en cuenta la coincidencia en la expresión de DUSP6 y el receptor P2X7 en la misma ventana temporal, era esperable que este receptor pudiera estar regulando la expresión y/o actividad de esta fosfatasa (Figura 19).



**Figura 19. Determinación de los niveles de las proteínas P2X7, DUSP6, DUSP1 y de pERK1,2 a lo largo de la maduración del cultivo de las neuronas granulares.** Mediante experimentos de Western Blot se analizó la variación de estas proteínas obtenidas a partir de lisados celulares a distintos días de cultivo, según se indica en el diagrama. La cuantificación de todas las proteínas analizadas se representa en la gráfica, normalizadas frente a los valores obtenidos para GAPDH en cada experimento. Se muestran las imágenes de las bandas correspondientes a experimentos representativos de los resultados obtenidos. Los datos se han representado como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  respecto al valor inicial a 2 DIV.

También se examinaron las variaciones del ARN mensajero de *Dusp1* y *Dusp6* a lo largo del cultivo. Como era de esperar, la expresión del ARN mensajero se produjo de manera más adelantada en el tiempo, precediendo a la expresión de la proteína. En este caso, los niveles del transcrito de *Dusp6* eran más elevados en los primeros días de cultivo *in vitro*, 2 DIV, cuando el cultivo todavía está en proceso de diferenciación, disminuyendo progresivamente a 6 y 10 DIV, cuando el cultivo ya está completamente diferenciado. En el caso del *Dusp1* los niveles en ARN mensajero fueron incrementando a lo largo de la diferenciación del cultivo, pese a no traducirse en unos mayores niveles de proteína (Figura 20).



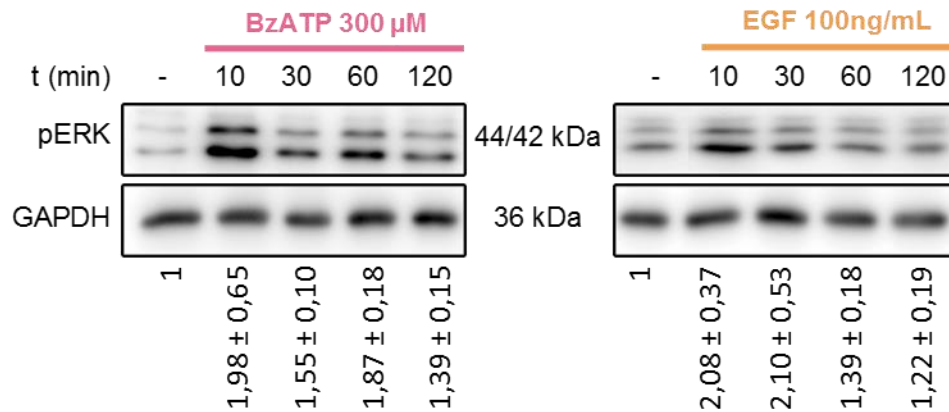
**Figura 20. Variación de los niveles de ARN mensajero de *Dusp6* y *Dusp1* a lo largo de la maduración del cultivo de las neuronas granulares.** Mediante experimentos de PCR Cuantitativa se analizó la variación en la expresión de estos transcritos obtenidos a partir de lisados celulares a distintos días de cultivo, según se indica en el diagrama. Todos los genes analizados se representan en el diagrama, normalizados frente a los valores obtenidos para *Gapdh* en cada experimento. Los datos se han representado como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \* $p < 0,05$  respecto al valor inicial a 2 DIV.

## 2. Los receptores P2X7 y de EGF regulan los niveles de expresión de la proteína fosfatasa DUSP6 en neuronas granulares de cerebelo de rata.

### 2.1. Los receptores P2X7 y de EGF regulan la fosfatasa DUSP6 de manera bifásica.

Los experimentos sobre cómo se producía la modulación de la fosfatasa DUSP6 por el receptor P2X7 se llevaron a cabo en cultivos diferenciados a 7-10 DIV, ya que se encuentra entre el rango de DIV en el que se habían observado mayores niveles de expresión del receptor. A tal fin, se estudiaron los niveles de DUSP6 después de realizar estimulaciones a distintos tiempos con el agonista P2X7, BzATP. Anteriormente, nuestro grupo había demostrado mediante experimentos de Western Blot con anticuerpos fosfo-específicos que la estimulación del receptor P2X7 incrementaba los niveles de fosforilación y, por tanto, la activación de la cascada de señalización de ERK1,2 (Ortega *et al.*, 2011). En estos experimentos las estimulaciones se habían llevado a cabo en medio salino, sin factores de crecimiento. Por ello, en primer lugar, se comprobó el efecto de BzATP en medio de cultivo estándar, sin la retirada de los factores tróficos. Como se muestra en la Figura 21, ratificamos que se reproducía la fosforilación de ERK1,2 mediada por el receptor P2X7, alcanzando su nivel máximo a los 10 minutos de

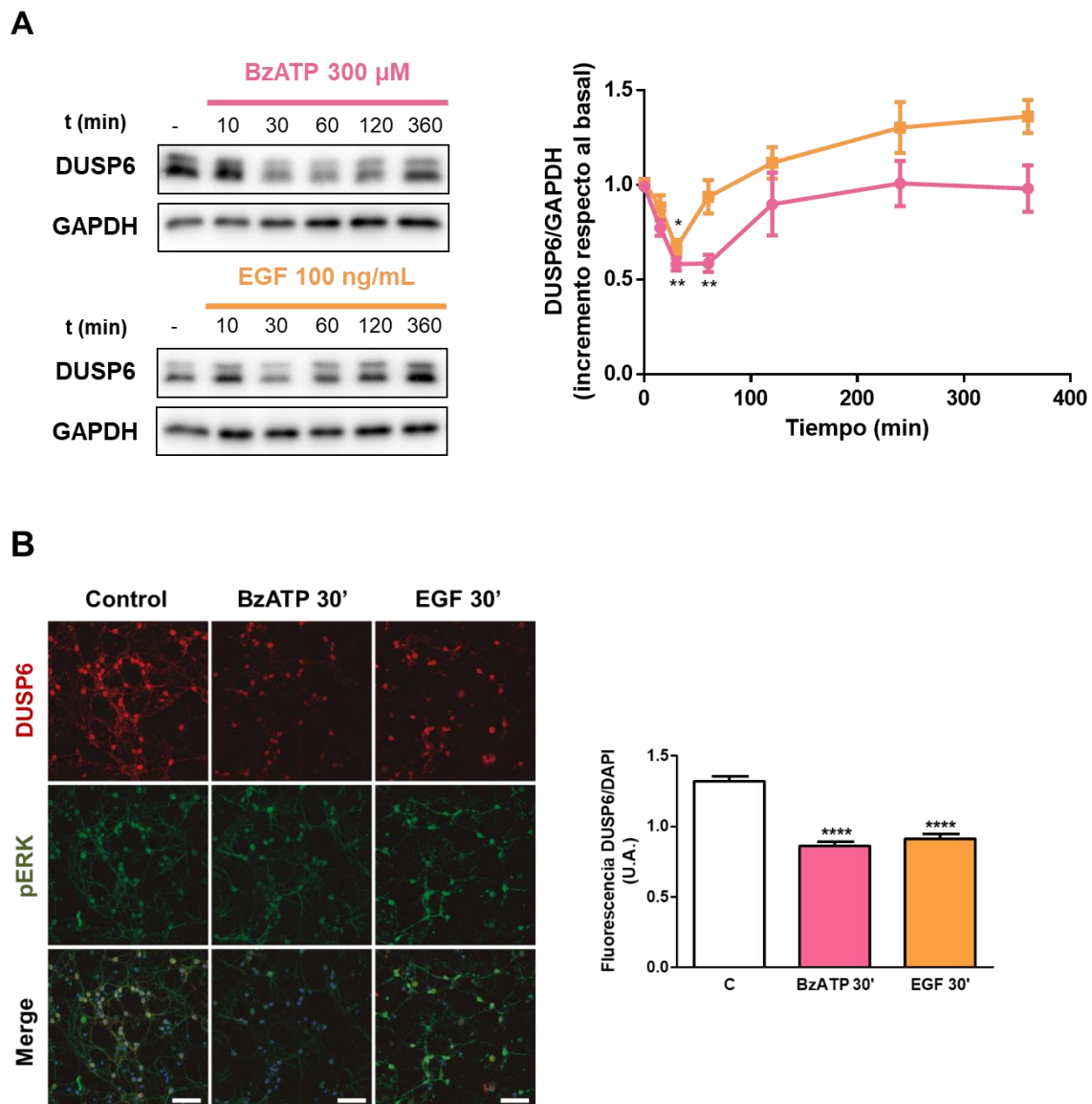
estimulación con el agonista nucleotídico BzATP. A continuación, los niveles de la fosforilación de ERK1,2 fueron disminuyendo hasta recuperar los valores basales tras 2 horas de estimulación. Se empleó la estimulación con el factor de crecimiento EGF (100 ng/mL) como control positivo de esta vía de señalización, obteniendo resultados similares en cuanto a la activación transitoria de ERK1,2.



**Figura 21. La estimulación de los receptores P2X7 y de EGF induce la activación de ERK1,2 de manera transitoria en las neuronas granulares.** Las células fueron estimuladas con BzATP (300 μM) o (EGF 100 ng/mL) durante los tiempos indicados en la imagen. La fosforilación de ERK1,2 fue detectada mediante experimentos de Western Blot empleando un anticuerpo fosfo-específico. Se muestran las imágenes con las bandas correspondientes a experimentos representativos de los resultados obtenidos. Los valores de la parte inferior de la imagen representan la cuantificación de los valores obtenidos normalizados respecto a la detección de GAPDH, y están representados como la media ± SEM de distintos experimentos realizados con diferentes cultivos (n=7).

También se quiso comprobar si esta activación de ERK1,2 iba acompañada de una variación en los niveles de expresión de la fosfatasa DUSP6. Para ello realizamos experimentos de Western Blot para la detección de la fosfatasa, en los que pudimos observar un patrón bifásico en los niveles de expresión. La estimulación del receptor P2X7 promovía una disminución inicial de los niveles de la proteína DUSP6, observándose un descenso de un 20-25% tras 15 minutos de estimulación, alcanzando el mínimo a los 30 minutos de estimulación, cuando se reducían aproximadamente en un 45% los niveles de DUSP6 (Figura 22A). Con estos datos se pudo estimar que el tiempo de vida media de la proteína DUSP6 se sitúa en torno a los 17,5 minutos.

En una segunda fase, se producía una recuperación de los niveles de DUSP6. Se observó que se alcanzaban de nuevo los niveles basales de DUSP6 a partir de 2 horas de estimulación con el agonista nucleotídico. Esta segunda fase podría deberse a un incremento de la síntesis *de novo* de la proteína DUSP6. Se observaba el mismo patrón bifásico al estimular el receptor de EGF. Si bien, en este caso, la disminución inicial en los niveles de DUSP6 era más aguda y se producía en los primeros 15-30 minutos, para recuperarse prácticamente por completo tras 1 hora de estimulación con el factor de crecimiento, e incluso incrementándose por encima de los niveles basales tras 2 horas de estimulación (Figura 22A). La disminución inicial de los niveles de la proteína se corroboró mediante experimentos de inmunocitofluorescencia (Figura 22B), en los que se observó una menor intensidad de la fluorescencia para el marcaje de DUSP6 a los 30 minutos de estimulación con BzATP y EGF.

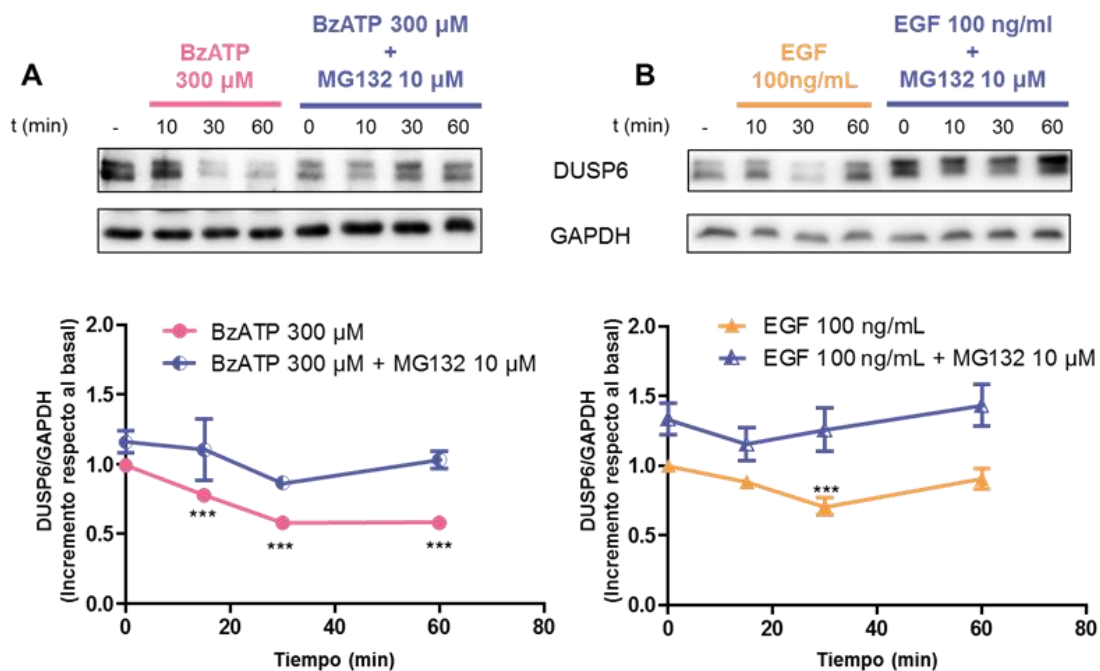


**Figura 22. La estimulación de los receptores P2X7 y de EGF regula los niveles de la fosfatasa DUSP6 en neuronas granulares.** (A) Las neuronas granulares de cerebelo se estimularon con BzATP (300  $\mu$ M) en color rosa o EGF (100 ng/ml) en color amarillo, a distintos tiempos y se cuantificaron los niveles de DUSP6 y de GAPDH mediante inmunodetección por Western Blot. En la figura se muestran las imágenes con las bandas obtenidas en un experimento de Western Blot representativo de los resultados obtenidos con cada efector a la izquierda, y el diagrama de la cuantificación a la derecha, donde se muestran los valores obtenidos para DUSP6 normalizados frente a GAPDH. (B) Imágenes representativas obtenidas de experimentos de inmunocitofluorescencia para la detección de la proteína DUSP6 (rojo) y de pERK1,2 (verde) en células controles o estimuladas con los agonistas BzATP (300  $\mu$ M) o EGF (100 ng/mL) durante 30 minutos. Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Las barras de escala representan 50  $\mu$ m. En el diagrama de barras se representa la ratio de la intensidad de fluorescencia de DUSP6 relativizado respecto a la intensidad de fluorescencia de DAPI de cada célula analizada. Los datos se han representado como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\*\* $p$  < 0,0001; \*\* $p$  < 0,01; \* $p$  < 0,05, respecto al control no estimulado.



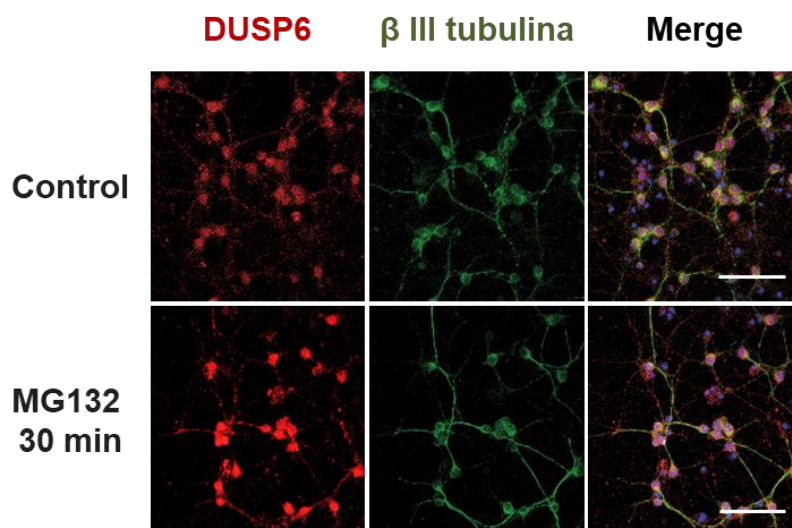
Resulta importante destacar que este patrón bifásico de expresión de DUSP6 se corresponde de manera inversa con la activación de ERK1,2, coincidiendo en el tiempo los niveles mínimos de expresión de DUSP6 con la máxima fosforilación de ERK1,2. Por otro lado, la recuperación de los niveles de proteína de DUSP6 concuerda con una bajada en los niveles de fosforilación de ERK1,2. Esto parece indicar que DUSP6 podría estar implicada en la regulación de la fosforilación de ERK1,2 y éstas a su vez en la modulación de la estabilidad de la fosfatasa.

Para comprobar esta hipótesis y saber cuál era el mecanismo responsable de la caída inicial de los niveles de DUSP6 se decidió estudiar si los niveles de proteína disminuían por una degradación proteasomal. Para ello se realizaron preincubaciones durante 30 minutos con el inhibidor del proteasoma MG132 a una concentración de 10  $\mu$ M, antes de la estimulación con los agonistas correspondientes, BzATP y EGF. Se observó que la reducción de los niveles de proteína se veía bloqueada por el uso de este compuesto, ratificándose la hipótesis de la degradación vía proteasomal de DUSP6 (Figura 23).



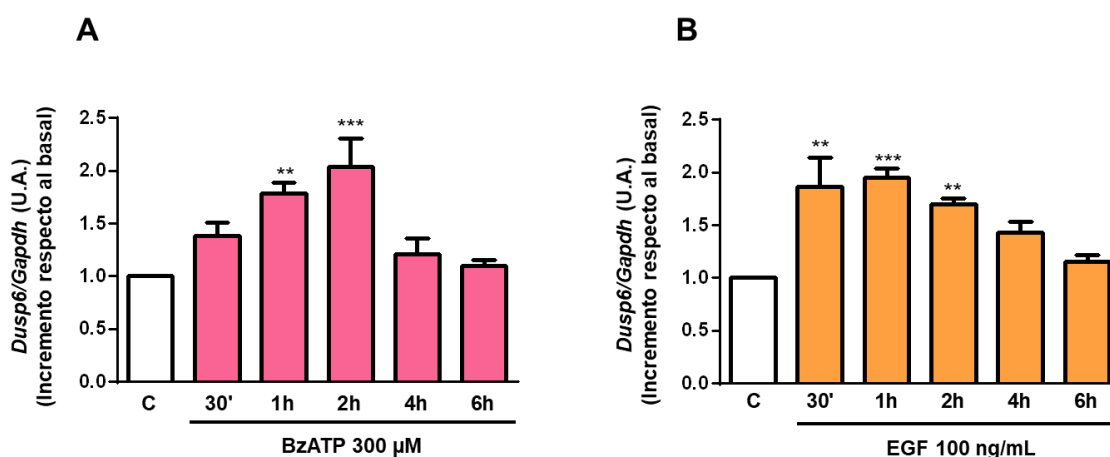
**Figura 23. Efectos de la inhibición del proteasoma en los cambios inducidos por BzATP y EGF en los niveles de DUSP6.** Para los tratamientos con MG132, las células se incubaron en presencia y ausencia de este compuesto a una concentración de 10  $\mu$ M durante 30 minutos previos a la adición del agonista correspondiente: (A) BzATP (300  $\mu$ M) o (B) EGF (100 ng/mL), durante los tiempos indicados. Los diagramas representan la cuantificación de los niveles de DUSP6 a lo largo del tiempo, obtenidos en los experimentos de Western Blot, normalizados frente al valor de GAPDH en cada experimento. Los datos se han representado como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\*p < 0,001 respecto al control no estimulado.

El efecto del inhibidor del proteasoma también se verificó mediante inmunocitofluorescencia. En la Figura 24 se puede observar que el pretratamiento con MG132 incrementó los niveles de DUSP6 principalmente a nivel citoplasmático, encontrándose dispersa tanto por el soma como en los procesos celulares.



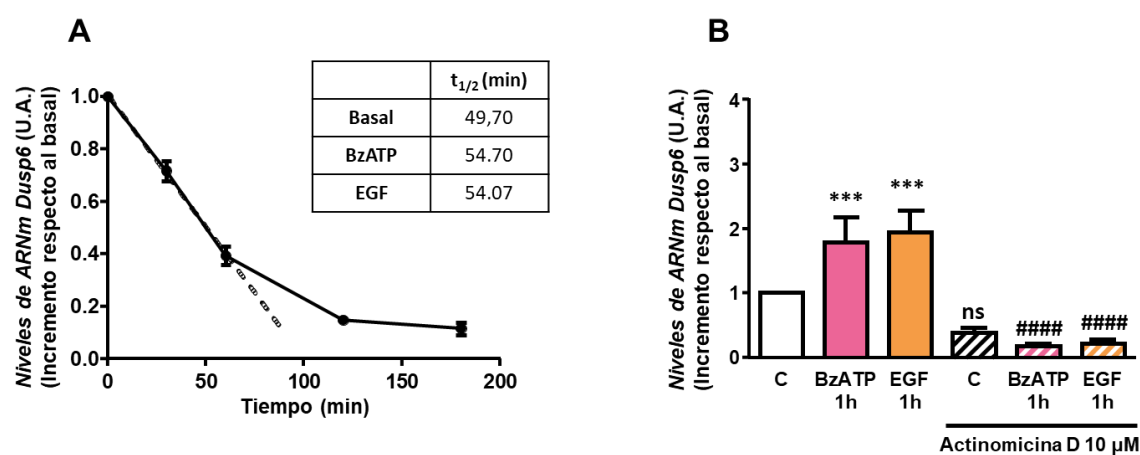
**Figura 24. Efectos de la inhibición del proteasoma en los cambios inducidos por BzATP y EGF en los niveles de DUSP6.** Las células sembradas en cubreobjetos tratados con Poli-D-Lisina y tratadas con MG132 10  $\mu$ M durante 30 minutos, fueron fijadas y se detectó la presencia de DUSP6 (rojo) y del marcador de citoesqueleto específico de neuronas,  $\beta$ -III tubulina (verde) con anticuerpos específicos. Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Las barras de escala representan 50  $\mu$ m.

Para conocer el mecanismo implicado en la restauración de los niveles basales de DUSP6 durante la segunda fase de estimulaciones prolongadas con BzATP y EGF, se llevaron a cabo estudios de PCR Cuantitativa a fin de hacer un seguimiento de la expresión del ARN mensajero de *Dusp6*. Como se muestra en la Figura 25, las estimulaciones de los receptores P2X7 y de EGF promovieron un rápido incremento en los niveles de ARN mensajero de *Dusp6* a partir de los 30 minutos de estimulación, siendo la subida más rápida con EGF. Los niveles máximos se alcanzaron tras 1-2 horas de incubación con los agonistas, decayendo de nuevo hasta los niveles basales a las 4-6 horas, y promoviendo el EGF una caída mucho más lenta y progresiva (Figura 25).



**Figura 25. La estimulación de los receptores P2X7 y de EGF incrementa los niveles de ARN mensajero de *Dusp6*.** Las células fueron estimuladas con el agonista nucleotídico BzATP (300  $\mu$ M) (A) o con el factor de crecimiento EGF (100 ng/mL) (B), durante los tiempos indicados. Los niveles de ARN mensajero fueron detectados, mediante experimentos de PCR Cuantitativa, como se describe en Métodos. La expresión del gen *Dusp6* fue normalizada frente a los niveles del gen *Gapdh* y los datos representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\* $p$  < 0,001; \*\* $p$  < 0,01 respecto al control no estimulado.

A fin de verificar si este incremento en los niveles de ARN mensajero era debido a una inducción transcripcional o a una estabilización del transcrito, se realizaron incubaciones con el inhibidor de la transcripción Actinomicina D (10 $\mu$ M). El uso de este compuesto permitió observar un descenso gradual de la expresión génica de *Dusp6*. En este tipo de experimentos se pudo calcular el tiempo de vida media del ARN mensajero de *Dusp6*, que es de aproximadamente unos 49,70 minutos, no variando significativamente con las estimulaciones realizadas con BzATP y EGF (Figura 26A). Y además, se observó que preincubando las células con Actinomicina D se bloqueaban por completo los incrementos de expresión observados con BzATP y EGF (Figura 26B). Estos resultados indican que la estimulación de los receptores P2X7 y de EGF promueve la inducción transcripcional del gen *Dusp6*, y que este efecto es el responsable de la recuperación de los niveles de proteína DUSP6 durante estimulaciones prolongadas de estos receptores.

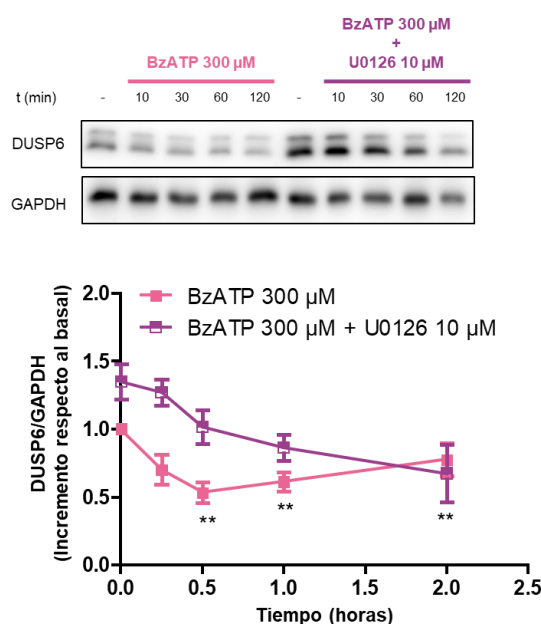


**Figura 26. La expresión de *Dusp6* es regulada a nivel transcripcional por los receptores P2X7 y de EGF.** (A) La gráfica muestra la disminución de los niveles de ARNm de *Dusp6* a distintos tiempos de tratamiento con Actinomicina D (10  $\mu$ M) y los niveles del ARN mensajero de *Dusp6* se detectaron mediante PCR Cuantitativa y fueron normalizados frente a los valores obtenidos para *Gapdh*. El tiempo de vida media del gen se calculó mediante regresión lineal (---) empleando los puntos obtenidos del tratamiento con Actinomicina D. Las células también fueron tratadas con BzATP (300  $\mu$ M) o EGF (100 ng/mL) durante 1 hora y posteriormente tratadas con Actinomicina D (10  $\mu$ M) a los mismos tiempos que los indicados en la gráfica, a fin de calcular la vida media en presencia de los agonistas como se representa en la tabla adjunta. (B) Las células fueron preincubadas con Actinomicina D (10  $\mu$ M) durante 1 hora previa a la adición de BzATP (300  $\mu$ M) o EGF (100 ng/mL) durante 1 hora. Los niveles de ARN mensajero de *Dusp6* fueron cuantificados como se ha mencionado previamente. Los datos han sido representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\* $p$  < 0,001 respecto al control no estimulado y ##### $p$  < 0,0001; ns, no significativo, frente al control o estimulación correspondiente no tratados con Actinomicina D.

## 2.2. Las proteínas ERK1,2 regulan el recambio de la proteína DUSP6 y la expresión del gen *Dusp6*.

De acuerdo con los estudios realizados en otros modelos celulares, la regulación del recambio de la proteína DUSP6 se produce por distintos mecanismos, muchos de los cuales son dependientes de la señalización de ERK1,2. Para determinar si la activación de la vía de señalización de ERK1,2 era requerida para la degradación de DUSP6 en la primera fase de estimulación de los receptores P2X7 y de EGF, se utilizó el inhibidor U0126. Este compuesto inhibe a la proteína quinasa activada por mitógenos extracelulares, MEK, responsable de la fosforilación de ERK1,2. El compuesto U0126

se empleó a una concentración de 10  $\mu$ M, realizando preincubaciones de 30 minutos antes de estimular con el agonista correspondiente. Estos pretratamientos bloquearon parcialmente la disminución de los niveles de DUSP6 producida a tiempos cortos de estimulación del receptor P2X7 (Figura 27). El hecho de que el bloqueo solo fuera parcial podría ser indicativo de que mecanismos adicionales, distintos de la señalización a través de ERK1,2, estén implicados en la degradación de la proteína fosfatasa DUSP6. Se obtuvieron resultados similares cuando se estimularon los receptores de EGF (datos no mostrados).

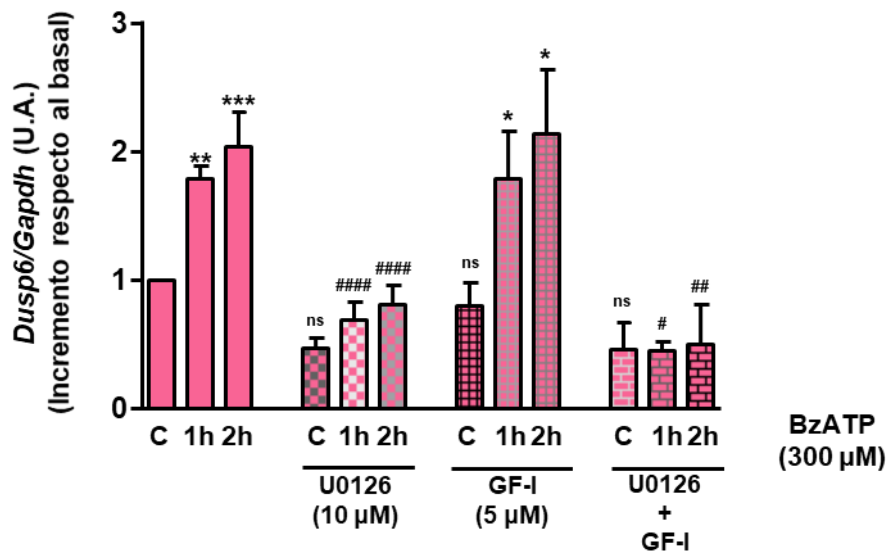


**Figura 27. Efectos de la inhibición de la ERK1,2 en la variación de los niveles de DUSP6 a lo largo del tiempo.** Las células fueron preincubadas durante 30 minutos en presencia y ausencia del inhibidor de MEK, U0126, a una concentración de 10  $\mu$ M antes de la adición del agonista nucleotídico BzATP (300  $\mu$ M) durante los tiempos indicados en la imagen. Se muestran las imágenes con las bandas correspondientes a un experimento de Western Blot, representativo de los resultados obtenidos. Los diagramas corresponden a la cuantificación de DUSP6 normalizada frente a la GAPDH de cada uno de los experimentos. Los datos han sido representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\* $p < 0,01$  respecto al control no estimulado.

Se sabe que uno de los mecanismos mediante los cuales ERK1,2 regula el recambio de DUSP6, se produce a través de la fosforilación de la fosfatasa en el residuo serina 197, promoviendo su ubiquitinización y consiguiente degradación vía proteasomal (Marchetti *et al.*, 2005). Para comprobar si en nuestro modelo estaba implicado este mecanismo, se empleó el anticuerpo fosfo-específico, anti-fosfo-DUSP6 (Ser197), para la detección de esta forma fosforilada. Sin embargo, no se observó ningún marcaje específico. Por tanto, fosforilación de DUSP6 para su degradación vía proteasoma podría ocurrir en otros residuos distintos a la Ser197, o por la fosforilación de DUSP6 por otras proteínas quinasas.

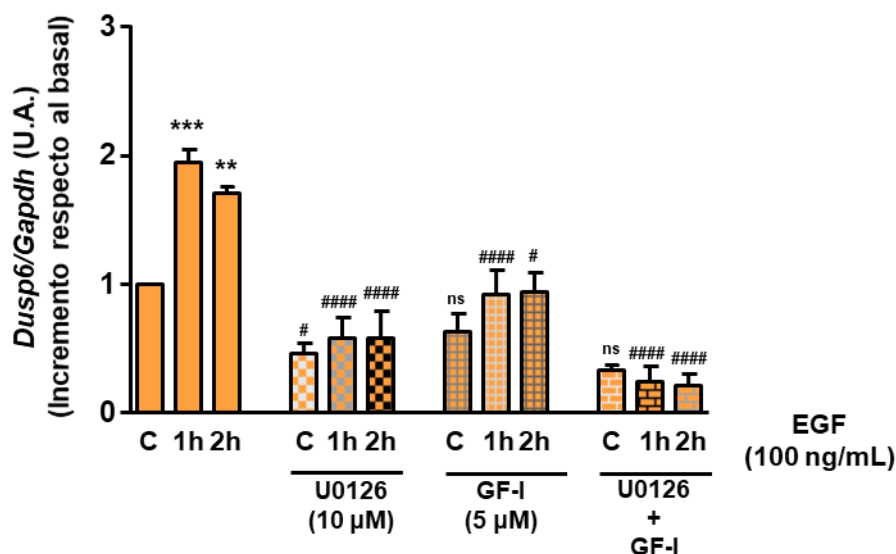
El restablecimiento de los niveles de proteína DUSP6 a tiempos largos de estimulación con el nucleótido o el factor de crecimiento, también se veía bloqueado con el uso del inhibidor U0126, lo que parecía indicar un posible papel de ERK1,2 en la inducción transcripcional de *Dusp6*. Para comprobarlo, se llevaron a cabo experimentos de PCR Cuantitativa preincubando con U0126, antes de la adición de los agonistas correspondientes. Los resultados obtenidos muestran que el incremento de los niveles de expresión génica de *Dusp6* inducidos por BzATP se veían revertidos en gran medida cuando se inhibía la señalización llevada a cabo por ERK1,2, si bien no se pueden descartar otros mecanismos alternativos y/o coadyuvantes de esta inducción (Figura 28).

En este contexto, también se comprobó el efecto de inhibidores de otras proteínas quinasas que pudiesen ser activadas tras la estimulación del receptor P2X7, como es el caso de la PKC. Como se muestra en la figura, el pretratamiento con el inhibidor de PKC, GF-I a una concentración de 5  $\mu$ M, no bloqueaba la inducción transcripcional de *Dusp6*, aunque el pretratamiento con U0126 combinado con GFI, bloqueó totalmente la inducción transcripcional del gen.



**Figura 28. Efecto de los inhibidores de ERK y de PKC sobre la inducción transcripcional de *Dusp6* a través de la estimulación del receptor P2X7.** Las células fueron preincubadas durante 30 minutos en presencia y ausencia del inhibidor de MEK, U0126, a una concentración de 10  $\mu$ M; el inhibidor de PKC, GF-I, a una concentración de 5  $\mu$ M; o una combinación de ambos durante 30 minutos antes de la adición del agonista nucleotídico BzATP (300  $\mu$ M) durante los tiempos indicados en el diagrama. En la imagen se muestra la inducción transcripcional del gen *Dusp6* detectado mediante experimentos de PCR Cuantitativa. La expresión de *Dusp6* se normalizó frente a los valores del gen control *Gapdh*. Los datos se han representado como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 5 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\* $p$  < 0,001; \*\* $p$  < 0,01; \* $p$  < 0,05 respecto al control; y #### $p$  < 0,0001; ### $p$  < 0,01; # $p$  < 0,05; ns, no significativo, frente al control o estimulación correspondiente no tratados con inhibidores.

En el caso del EGF, la inducción transcripcional parece ser totalmente dependiente de la activación de las proteínas ERK1,2, ya que las preincubaciones con el inhibidor U0126 bloquearon completamente dicha inducción de *Dusp6*. Sin embargo, y al contrario de lo que ocurre con la estimulación del receptor P2X7, el GF-I también parecía frenar la transcripción del gen *Dusp6*. Curiosamente, al combinar ambos inhibidores, como se había hecho con BzATP, no sólo se observó un bloqueo de la transcripción, sino que se apreció una ligera disminución en los niveles de ARN mensajero del gen (Figura 29). En este caso parece que PKC podría estar desempeñando un papel desestabilizador del gen *Dusp6*.



**Figura 29. Efecto de los inhibidores de ERK y de PKC sobre la inducción transcripcional de *Dusp6* a través de la estimulación del receptor de EGF.** Las células fueron preincubadas durante 30 minutos en presencia y ausencia del inhibidor de MEK, U0126, a una concentración de 10  $\mu$ M; el inhibidor de PKC, GF-I, a una concentración de 5  $\mu$ M; o una combinación de ambos durante 30 minutos antes de la adición del factor de crecimiento EGF (100 ng/mL) durante los tiempos indicados en el diagrama. En la imagen se muestra la inducción transcripcional del gen *Dusp6* detectado mediante experimentos de PCR Cuantitativa. La expresión de *Dusp6* se normalizó frente a los valores del gen control *Gapdh*. Los datos se han representado como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 5 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$  respecto al control; y #### $p < 0,0001$ ; # $p < 0,05$ ; ns, no significativo, frente al control o estimulación correspondiente no tratados con inhibidores.

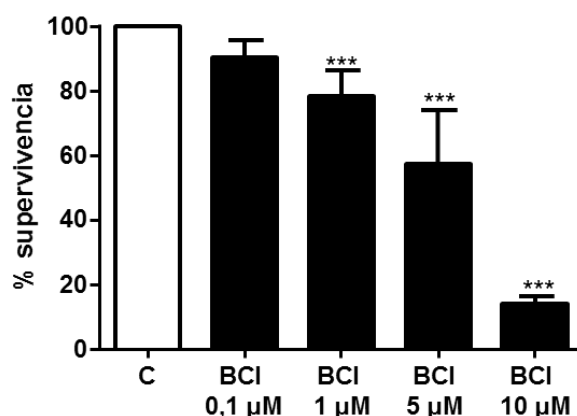
En conjunto, estos resultados confirman la participación de la señalización de ERK1,2 activada por los receptores P2X7 y de EGF como un eje fundamental para regular la expresión y el recambio de la proteína DUSP6.

### 2.3 Efecto del inhibidor de DUSP (BCI) en la señalización de MAP quinasas y fosfatasa.

La proteína fosfatasa DUSP6 parece ser específica para la inactivación de la señalización de ERK1,2, contribuyendo así a una regulación por retroalimentación negativa de esta vía de señalización. Para comprobar cómo DUSP6 podría estar regulando la activación de ERK1,2, y *viceversa*, en el modelo de las neuronas granulares, se analizó el efecto que podría tener el inhibidor alostérico de la actividad de DUSP6, BCI ( $IC_{50} = 12,3 \pm 4 \mu$ M, NCS150117; Molina *et al.* 2009).

El BCI resultó ser muy tóxico para las neuronas granulares, lo que es indicativo de que la desregulación en la señalización de las ERK1,2 puede tener consecuencias proapoptóticas en este modelo neuronal. Además de la toxicidad del BCI en estimulaciones prolongadas (Figura 30), se comprobó que estimulaciones a tiempos superiores a una hora con concentraciones de BCI 10  $\mu$ M, o bien estimulaciones superiores a 10 minutos con BCI 50  $\mu$ M, ya resultaban deletéreas para las células, causando una muerte celular masiva, de manera que no se pudieron realizar experimentos a tiempos y concentraciones superiores a los indicados.





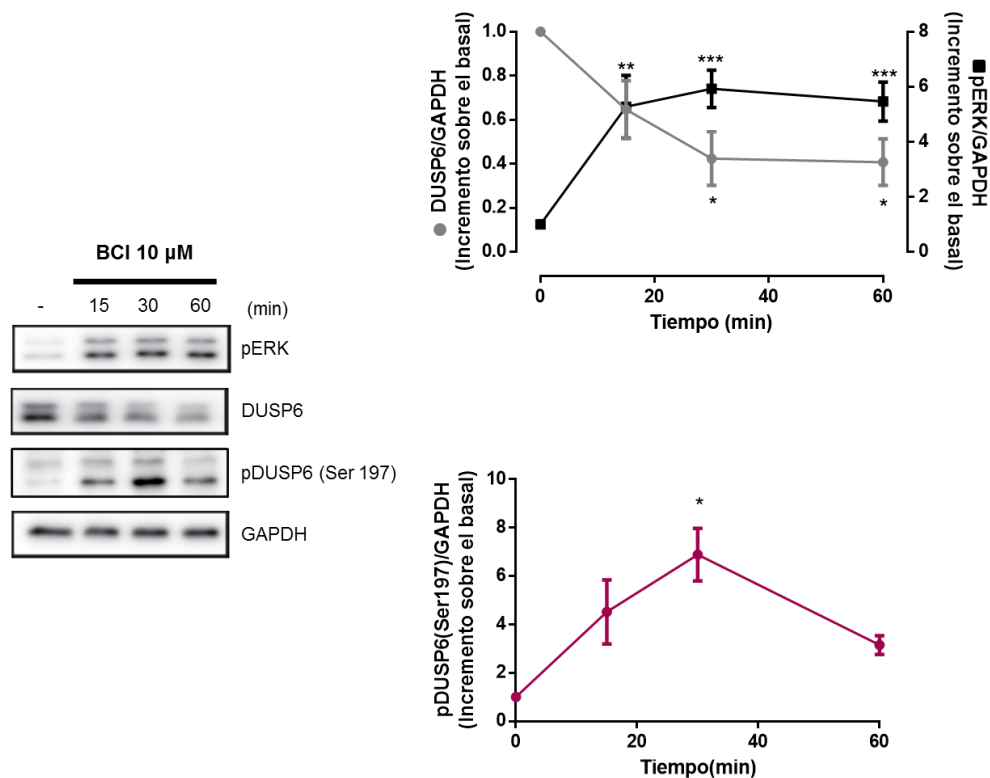
**Figura 30. Efectos de la estimulación con BCI sobre la supervivencia de las neuronas granulares de cerebelo de rata.** Las células en cultivo fueron tratadas durante 1 hora a las concentraciones de BCI indicadas en el diagrama. La viabilidad celular se evaluó por medio del ensayo de MTT 24 horas después. Los datos han sido representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\* $p < 0.001$  respecto a los niveles de células control no estimuladas.

Mediante experimentos de Western Blot se observó que el tratamiento de las neuronas granulares con BCI 10  $\mu$ M incrementaba los niveles basales de fosforilación de ERK1,2 de manera muy potente a los 15 minutos de tratamiento, manteniéndose elevados a lo largo del tiempo. Es interesante destacar que estos niveles de activación de ERK1,2 se correlacionan de manera inversa con el patrón de expresión de la proteína DUSP6, la cual disminuía de manera progresiva con el tratamiento en el tiempo con BCI (Figura 31A). La disminución en los niveles de proteína DUSP6 era indicativo de que podría estar teniendo lugar un proceso degradativo de DUSP6 inducido por los altos niveles de activación de ERK1,2. Por ello, se midieron los niveles de fosforilación de DUSP6 en la serina 197, que la marca para su degradación, y se comprobó que aumentaban con el tratamiento con BCI 10  $\mu$ M de manera paralela al aumento de fosforilación de ERK1,2.

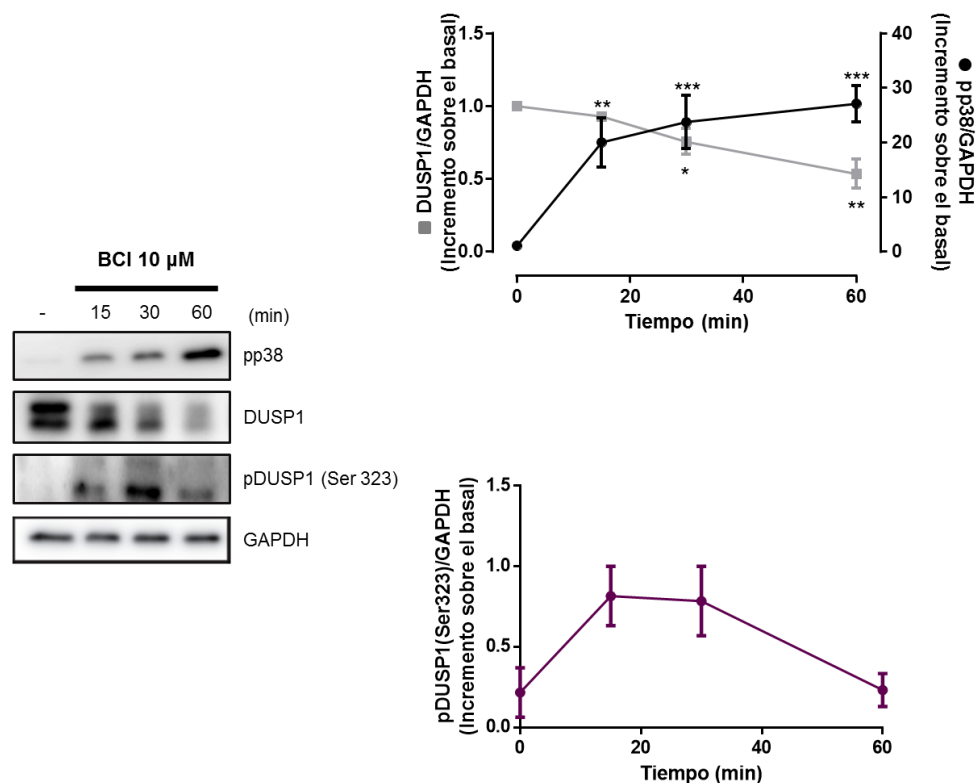
El BCI también se había propuesto como inhibidor de DUSP1 ( $IC_{50} = 11,5 \pm 2,8 \mu$ M; Molina *et al.* 2009). Teniendo en cuenta que p38 puede ser un sustrato de DUSP1, de manera paralela al análisis de la señalización de ERK1,2, se analizaron los niveles de p38 fosforilada. Se observó que el tratamiento con BCI también afectaba a la fosforilación de la proteína p38. El aumento de los niveles de fosforilación de p38, se producía de manera más progresiva y más demorada en el tiempo en comparación con el rápido incremento de los niveles de pERK1,2. Estos datos se pueden deber a que la fosforilación de p38 podría ser un proceso secundario derivado de la señalización de ERK1,2, o bien que el BCI podría estar afectando a la actividad de otras proteínas fosfatasa que pueden tener como sustratos ERK1,2 y/o p38, como DUSP1. Como era esperable, los niveles de DUSP1 también disminuían de manera progresiva con el tratamiento con BCI. De manera paralela a DUSP6, BCI promovía la fosforilación de DUSP1 dependiente de ERK1,2 en el residuo serina 323, que la marca para su degradación (Brondello *et al.*, 1999) (Figura 31B)



A



B



**Figura 31. Efectos del tratamiento con BCI sobre los niveles basales de las proteínas DUSP6, DUSP1, pERK1,2 y pp38 en neuronas granulares.** Las células fueron tratadas durante distintos tiempos con BCI (10  $\mu$ M) y se determinaron los niveles de proteínas indicadas en los lisados celulares mediante experimentos de inmunotransferencia. Las imágenes con las bandas son las obtenidas en un experimento representativo de los resultados obtenidos. Las gráficas representan la cuantificación de las funciones tiempo obtenidas mediante la normalización con los correspondientes niveles de GAPDH, y los datos han sido representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  respecto al control no tratado.

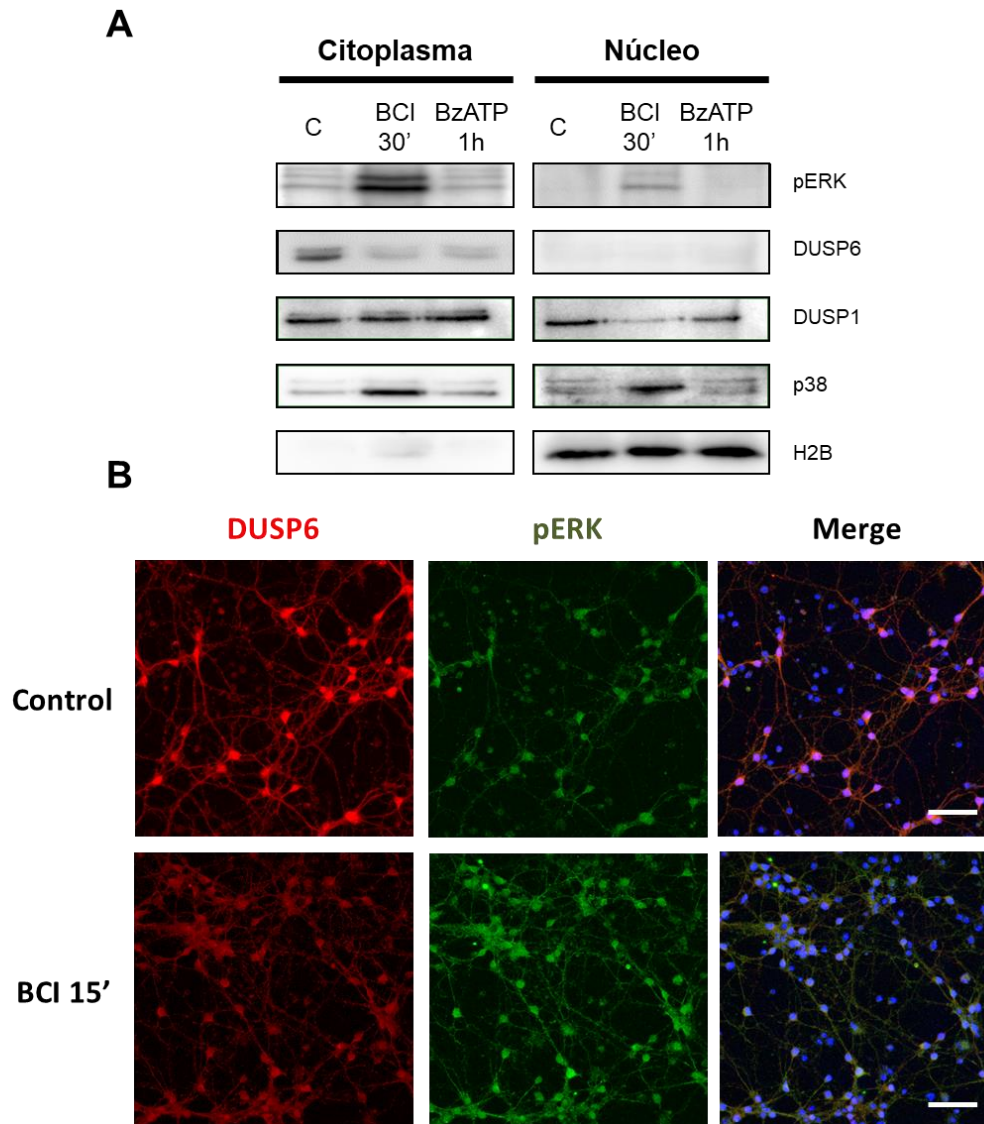
De los resultados anteriores se puede deducir que tanto ERK1,2 como p38 pueden ser los sustratos de DUSP1 y DUSP6 en las neuronas granulares, si bien para DUSP6 está plenamente establecido que exhibe preferencia por ERK1,2 (Camps *et al.*, 1998). Para confirmar la especificidad de sustrato de las dos fosfatasa en las neuronas granulares, se analizó la presencia de las MAPKs y DUSPs en las distintas fracciones subcelulares de extractos de neuronas granulares tratadas con BCI y estimuladas con BzATP.

En estos experimentos de Western Blot se pudo observar un importante incremento de la fosforilación de ERK1,2 con el tratamiento con BCI sobre todo a nivel citoplasmático y en menor medida a nivel nuclear, siendo el incremento exclusivamente citoplasmático en el caso de BzATP, muy débil en comparación con el obtenido con BCI. De acuerdo con su estructura, la localización de DUSP6 era eminentemente citoplasmática, disminuyendo sus niveles en este compartimento al estimular las neuronas granulares tanto con BCI, como con BzATP (Figura 32A). Se observó este mismo resultado en experimentos de inmunocitofluorescencia, con una bajada en el marcaje citoplásmico de DUSP6 a los 15 minutos de tratamiento con BCI, que se correspondía con un aumento de la fosforilación de ERK1,2 también repartido por todo el citoplasma celular (Figura 32B).

Del mismo modo que ERK1,2, la quinasa de estrés, p38, también mostró un notable incremento en sus niveles de fosforilación, en este caso, tanto a nivel nuclear como citoplasmático. La disminución en los niveles de DUSP1 a nivel nuclear tras el tratamiento con BCI podría explicar, tanto el débil incremento de fosforilación de ERK1,2 que se observaba en esta fracción, como el aumento de p38 (Figura 32A, B). Mediante experimentos de inmunocitofluorescencia se confirmó que las variaciones en los niveles de p38 y DUSP1 se producían principalmente en el núcleo (resultados no mostrados). DUSP1, pese a estar descrita como una fosfatasa de localización exclusivamente nuclear, parece estar también presente en el citoplasma. Las estimulaciones con BzATP durante 1 hora incrementaron ligeramente los niveles de DUSP1 a nivel citoplásmico, no afectando a sus niveles nucleares (Figura 32A).

De los resultados correspondientes a este primer apartado, se deduce que DUSP6 es una fosfatasa citosólica que desfosforila selectivamente ERK1,2 en las neuronas granulares de cerebelo. Además, DUSP6 se encuentra regulada por los receptores P2X7 y de EGF, siguiendo un patrón bifásico, tal y como ha sido descrito para distintos receptores de crecimiento en otros tipos celulares. Indicando que este mecanismo de regulación funciona como un mecanismo universal que es promovido por distintos tipos de mediadores extracelulares, no solo factores de crecimiento, sino también por receptores de nucleótidos, como el P2X7, que estén acoplados a la señalización de ERK1,2.

Asimismo, se ha puesto de manifiesto que en las neuronas granulares de cerebelo, además del tándem P2X7/DUSP6, la proteína fosfatasa DUSP1 también podría estar influyendo en la regulación de la señalización de ERK1,2 y de p38. Además, de acuerdo con los estudios realizados con el inhibidor BCI, igualmente podría constituir una diana para el receptor P2X7. Por ello, en el segundo apartado de este trabajo investigamos el papel del receptor P2X7 en la regulación de la fosfatasa DUSP1.



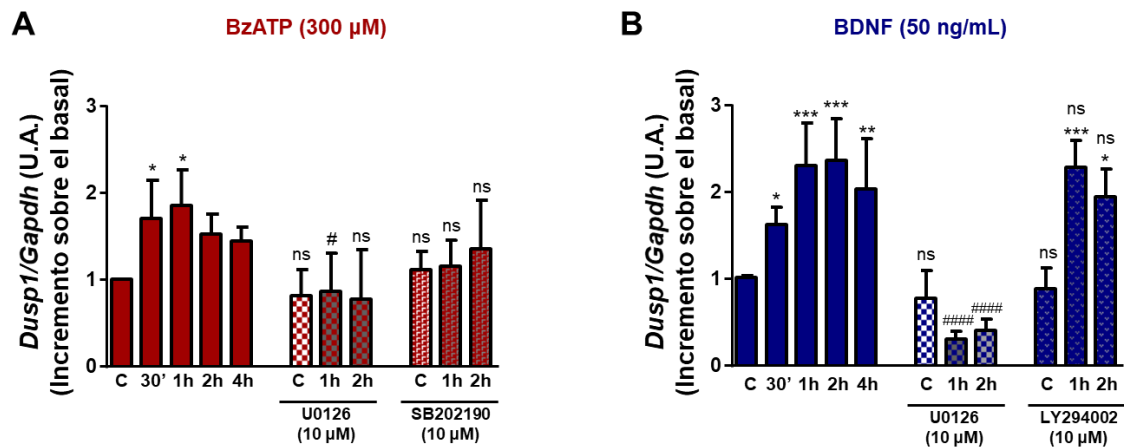
**Figura 32. Efecto de BCI y BzATP sobre los niveles y localización subcelular de las MAPKs y las fosfatasa DUSP6 y DUSP1.** (A) Las células se trataron con BCI (10  $\mu$ M, 30 minutos) o BzATP (300  $\mu$ M, 1 hora) y se aislaron las fracciones citosólica y nuclear, según el protocolo descrito en la sección de Métodos. La presencia de las proteínas pERK1,2, DUSP6, pp38 y DUSP1 se detectó mediante experimentos de Western Blot. La histona H2B se utilizó como marcador nuclear. En la imagen se muestran las bandas obtenidas en los extractos citoplasmáticos y nucleares en un experimento representativo. (B) Imágenes de inmunofluorescencia obtenidas para el marcaje con los anticuerpos frente a las proteínas DUSP6 (rojo) y pERK1,2 (verde). Las células sembradas en cubreobjetos tratados con Poli-D-Lisina se trataron con BCI (10  $\mu$ M, 15 minutos) y se fijaron con paraformaldehído 4%. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las barras de escala representan 50  $\mu$ m

### 3. Estudios de regulación de la proteína fosfatasa de especificidad dual DUSP1 por los receptores P2X7 y de BDNF en neuronas granulares de cerebelo de rata.

Como se ha mostrado anteriormente, la expresión de DUSP1 parece ser necesaria durante las primeras etapas de maduración de las neuronas granulares, en las que sería inducida por determinados agentes de diferenciación presentes en el cultivo (Figuras 19 y 20). La fosfatasa DUSP1 representa el prototipo del grupo de fosfatasas DUSPs/MKPs que son nucleares e inducibles. Su expresión es muy baja en condiciones basales y su inducción transcripcional se puede producir en respuesta a estímulos tróficos, como factores de crecimiento y neurotrofinas, la actividad sináptica y a señales de estrés. Por ello, se ensayaron distintos tipos de mediadores de relevancia fisiológica en las neuronas granulares, como el BDNF y los agonistas nucleotídicos P2X7, para estudiar si se encontraban entre las señales extracelulares que podían inducir la expresión de DUSP1 en estas neuronas. En trabajos previos ya se había constatado que la activación de receptores P2X7 y de BDNF presentaban puntos de convergencia en algunas cascadas de señalización para mediar acciones neuroprotectoras (Ortega *et al.*, 2010).

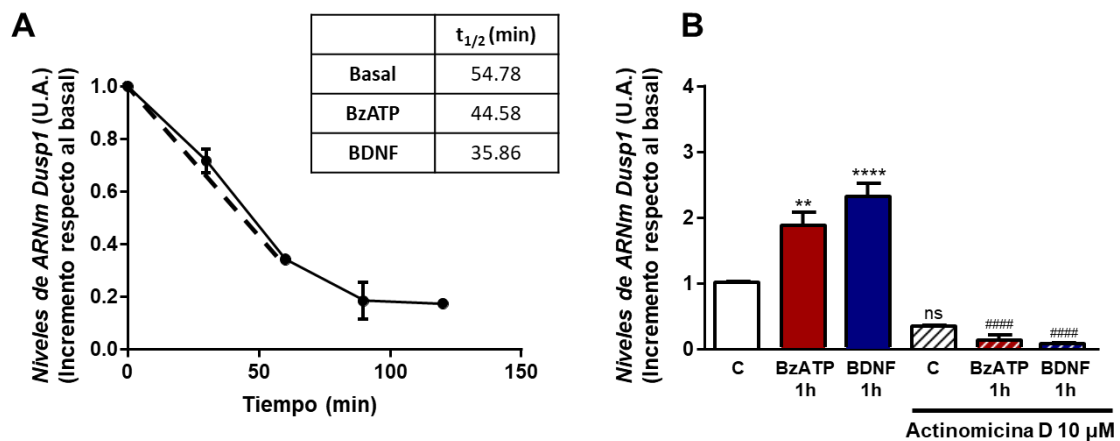
#### 3.1. Los receptores P2X7 y TrkB inducen la expresión génica de *Dusp1*.

Estos estudios se realizaron en cultivos de 7-10 DIV, para estar en las mismas condiciones que los estudios realizados con DUSP6. Para ello se estimularon las neuronas granulares a distintos tiempos con BzATP (300  $\mu$ M) o con BDNF (50 ng/mL). Como se muestra en la Figura 33, ambos efectores incrementaron los niveles de ARN mensajero para *Dusp1*. De acuerdo con su naturaleza inducible y con la descripción de *Dusp1* como un gen de expresión temprana, el máximo nivel de expresión de *Dusp1* aparecía muy rápido y alcanzaba el máximo a los 30 minutos de estimulación. Los niveles de *Dusp1* eran transitorios y bajaban a tiempos más largos de estimulación con BzATP, mientras que en el caso del BDNF, los niveles de expresión se mantenían elevados por encima del nivel basal hasta las 2-4 horas de estimulación. Es importante destacar que la estimulación con EGF no tuvo ningún efecto en la expresión de *Dusp1*. De manera similar a como ocurría con *Dusp6*, la inducción de *Dusp1* era dependiente de la señalización de ERK1,2, con ambos agonistas. También se analizó la posible contribución de la proteína p38 en la inducción transcripcional promovida por BzATP, ya que el receptor P2X7 está acoplado a la señalización de p38. Como se puede apreciar en la Figura 33A, el inhibidor de la proteína p38, SB202190 (10  $\mu$ M), incrementó ligeramente los niveles basales de ARNm de *Dusp1*, y también previno su inducción transcripcional. En el caso de la expresión de *Dusp1* inducida por BDNF, se observó que no dependía de la vía de señalización canónica del receptor TrkB de BDNF, la vía PI3K/Akt, ya que los niveles de *Dusp1* se mantenían sin variaciones en presencia del inhibidor de la PI3K, LY294002 (Figura 33B).



**Figura 33. Inducción de la expresión de *Dusp1* a través del receptor P2X7 y de BDNF.** Las neuronas granulares fueron preincubadas durante 30 minutos en presencia y ausencia de una concentración 10 µM del inhibidor de MEK, U0126, del inhibidor de p38, SB202190 o del inhibidor de PI3K, LY294002, y a continuación, fueron estimuladas a los tiempos indicados con BzATP (300 µM) (A) y/o BDNF (50 ng/mL) (B). Mediante experimentos de PCR Cuantitativa se analizaron los niveles de expresión del ARN mensajero del gen *Dusp1*. Estos datos se normalizaron frente a los valores obtenidos para el gen de expresión constitutiva *Gapdh*. Los datos han sido representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  respecto al control no estimulado y #### $p < 0,0001$ ; # $p < 0,05$ ; ns, no significativo, frente al control o estimulación correspondiente no tratados con inhibidores.

A fin de testar si estos incrementos en los niveles de ARN mensajero se correspondían con una estabilización del transcrito o a una inducción en la expresión del gen, se empleó Actinomicina-D para bloquear la transcripción.



**Figura 34. La expresión de *Dusp1* es regulada a nivel transcripcional por los receptores P2X7 y TrkB.** (A) La gráfica muestra la disminución de los niveles de ARNm de *Dusp1* a distintos tiempos de tratamiento con Actinomicina D (10 µM) y los niveles del ARN mensajero de *Dusp1* se detectaron mediante PCR Cuantitativa y fueron normalizados frente a los valores obtenidos para *Gapdh*. El tiempo de vida media del gen se calculó mediante regresión lineal (---) empleando los puntos obtenidos del tratamiento con Actinomicina D. Las células también fueron tratadas con BzATP (300 µM) o EGF (100 ng/mL) durante 1 hora y posteriormente tratadas con Actinomicina D (10 µM) a los mismos tiempos que los indicados en la gráfica, a fin de calcular la vida media en presencia de los agonistas como se representa en la tabla adjunta (B) Las células fueron preincubadas con Actinomicina D (10 µM) durante 1 hora previa a la adición de BzATP (300 µM) o BDNF (50 ng/mL) durante 1 hora. Los niveles de ARN mensajero de *Dusp1* fueron cuantificados como se ha mencionado previamente. Los datos han sido representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$  respecto al control no estimulado y #### $p < 0,0001$ ; ns, no significativo, frente al control o estimulación correspondiente no tratados con actinomicina D.

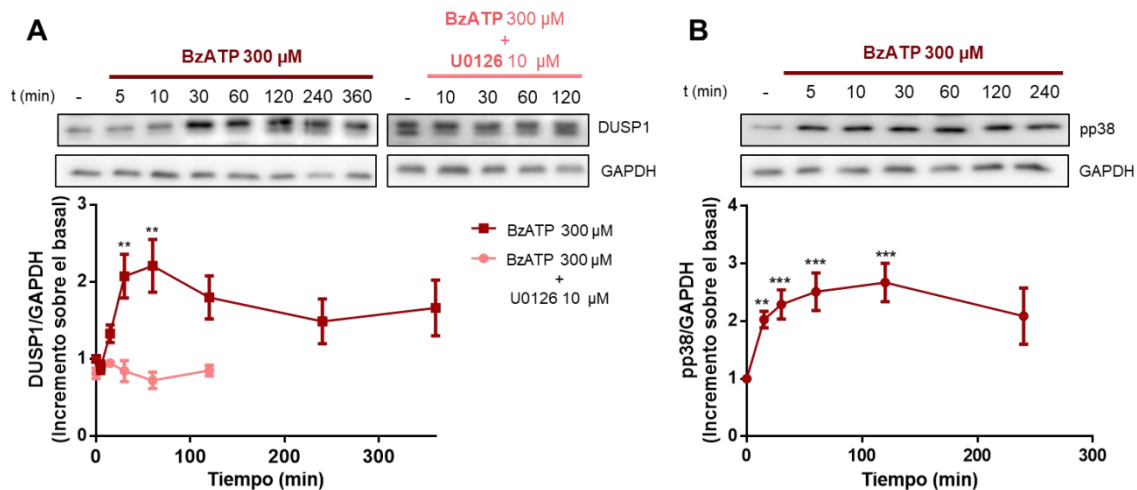
Al tratar las neuronas granulares en cultivo con BzATP o BDNF durante 1 hora y posteriormente incubar con el inhibidor de la transcripción, Actinomicina D, a distintos tiempos, se vio que se producía un descenso en los niveles de ARN mensajero de *Dusp1* en todos los casos, siendo más acusado en el caso de la coincubación con cada uno de los agonistas. Se obtuvo un valor de vida media de 54,78 minutos, que no cambió significativamente con BzATP, pero que sí disminuyó con el BDNF (Figura 34A). Por otro lado, también se realizaron experimentos añadiendo la Actinomicina D durante 1 hora antes de estimular las células con BzATP o BDNF durante 1 hora adicional. Como se ha descrito anteriormente, el tratamiento con los agonistas promovía un aumento de la expresión del gen, que se vio revertido con el pretratamiento con Actinomicina D. De hecho, se produjo una notable disminución en los niveles del gen *Dusp1* (Figura 34B). Estos resultados podrían sugerir un posible papel inductor de la expresión del ARN mensajero a través de la señalización llevada a cabo por los receptores P2X7 y TrkB.

Por tanto, se confirmó que no se trataba de una estabilización del ARNm de *Dusp1*, sino de una inducción de la expresión génica de *Dusp1*. A raíz de estos resultados se puede inferir que los receptores P2X7 y de BDNF regulan la fosfatasa DUSP1 a nivel de su inducción transcripcional, y que en ambos casos este efecto es dependiente de la señalización de ERK1,2 promovida por ambos receptores. A continuación, evaluamos si las variaciones a nivel del gen *Dusp1* se corresponden con variaciones en el nivel de proteína de DUSP1 en respuesta a las estimulaciones de los receptores P2X7 y de BDNF.

### **3.2. Análisis de la expresión de la proteína DUSP1 y su regulación por receptores P2X7.**

A fin de comprobar si los niveles de la proteína fosfatasa DUSP1 se podían ver modulados por la señalización ejercida por el receptor P2X7 se realizaron ensayos de Western Blot. Esta regulación por parte del receptor P2X7 mostró un patrón muy diferente al obtenido con la fosfatasa DUSP6. La estimulación con el agonista nucleotídico BzATP (300  $\mu$ M) a distintos tiempos promovió una expresión rápida y transitoria de la fosfatasa DUSP1 en las neuronas granulares de cerebelo. Se hallaron niveles máximos de expresión de la proteína entre 30 minutos y 1 hora de estimulación, disminuyendo paulatinamente, aunque sin llegar a recuperarse los niveles basales. Por tanto, estos resultados parecen indicar que la expresión transitoria del gen *Dusp1* se corresponde con un aumento de los niveles de proteína DUSP1. Además, de acuerdo con los resultados obtenidos para la inducción transcripcional de *Dusp1*, este incremento se veía revertido al realizar preincubaciones de 30 minutos con el inhibidor de la activación de ERK1,2, el compuesto U0126 (10  $\mu$ M), confirmando la implicación de esta MAPK en el incremento de los niveles de la fosfatasa DUSP1 (Figura 35A).





**Figura 35. Regulación de los niveles de expresión de la proteína DUSP1 por el receptor P2X7.** Las neuronas granulares fueron preincubadas durante 30 minutos en presencia y ausencia del inhibidor de MEK, U0126 (10 μM) y, a continuación, estimuladas a los tiempos indicados con BzATP (300 μM). Se detectaron los niveles de proteína DUSP1 (A) y de pp38 (B) mediante experimentos de Western Blot. Los valores obtenidos se normalizaron frente a los correspondientes niveles de GAPDH. Se muestra un diagrama de la cuantificación de los niveles de proteína a lo largo del tiempo y las imágenes con las bandas obtenidas en un experimento representativo. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; respecto al control no estimulado.

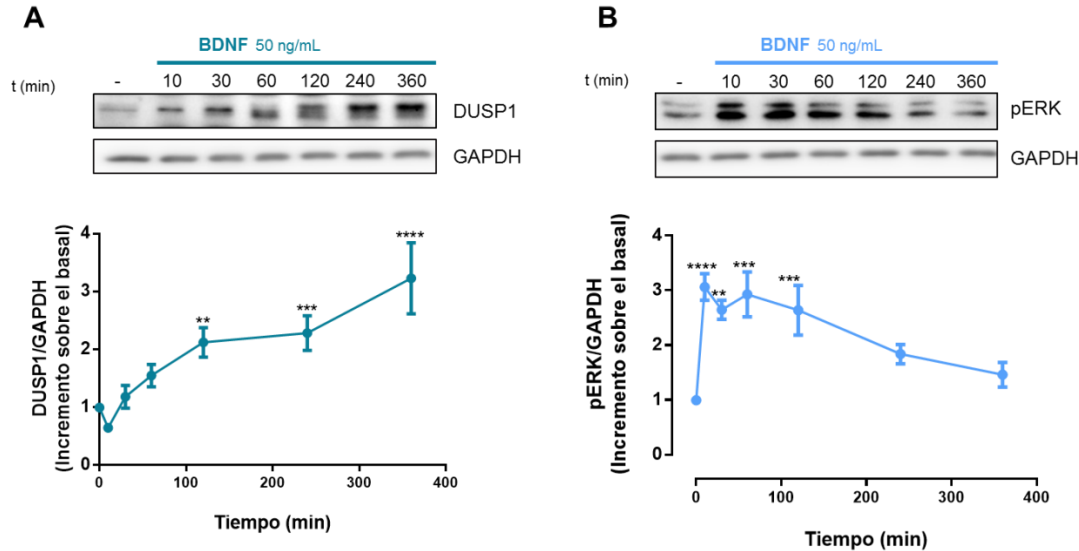
Puesto que la expresión de *Dusp1* inducida por BzATP también parecía depender de p38, se analizó el patrón de activación de p38 por parte del receptor P2X7. Como se observa en la figura 35B, los niveles de fosforilación de p38 eran más altos y se mantenían durante más tiempo que los obtenidos para ERK1,2 (Figuras 21 y 36B). Este patrón de activación era muy diferente al obtenido para DUSP1, sugiriendo, por tanto, que p38 no parecía estar implicada en el aumento de la proteína DUSP1 mediada por el receptor P2X7.

### 3.3. BDNF regula los niveles de la proteína fosfatasa DUSP1 en las neuronas granulares.

Las estimulaciones de las neuronas granulares con la neurotrofina BDNF también promovieron un incremento en los niveles de proteína DUSP1 de manera gradual en el tiempo. Sin embargo, a diferencia del patrón transitorio obtenido con la estimulación del receptor P2X7, el aumento en los niveles de DUSP1 era significativo a tiempos de estimulación de 1h y se incrementaba progresivamente hasta las 6 horas de estimulación (Figura 36A). Esta pauta concuerda con una inducción de la expresión de *Dusp1* por BDNF más mantenida en el tiempo (Figura 33B). Es necesario indicar que, a tiempos muy cortos de 10 minutos de estimulación, se podía observar una caída muy rápida en los niveles de DUSP1, que se recuperaba rápidamente a los 30 minutos.

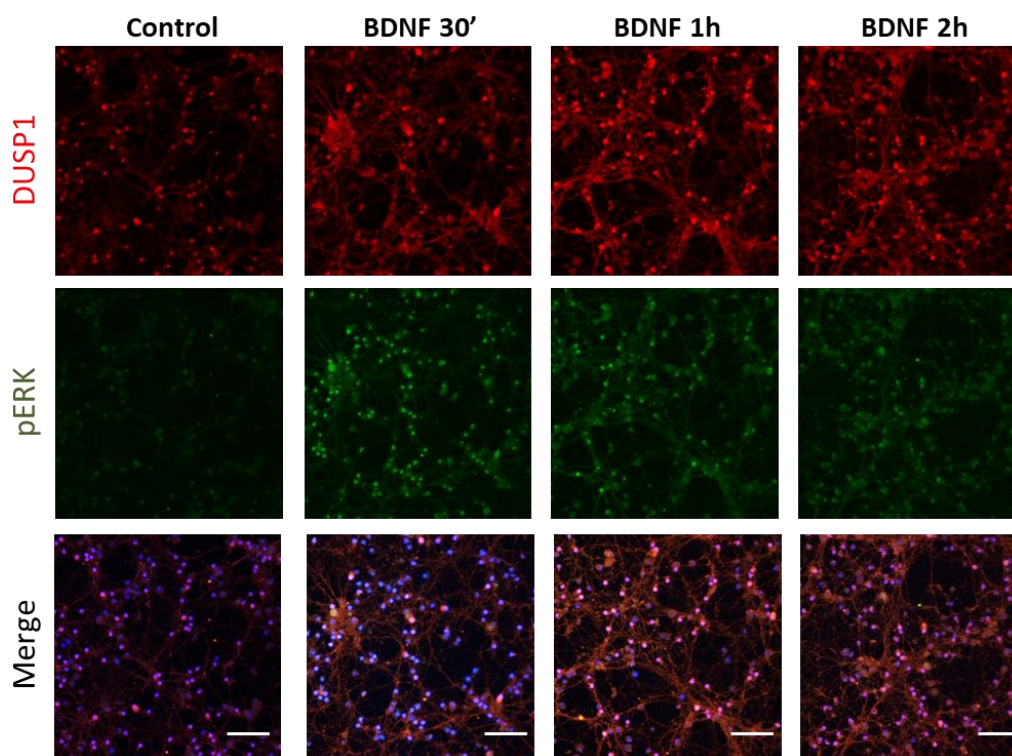


A su vez, la estimulación del receptor TrkB incrementaba los niveles de fosforilación de ERK1,2 de manera más potente que el receptor P2X7, describiendo un patrón inverso al observado en DUSP1. Las estimulaciones con BDNF (50 ng/mL) promovieron un rápido aumento de la fosforilación de ERK1,2 a tiempos cortos (10 minutos) de 3 veces en comparación con el basal, disminuyendo lentamente a lo largo del tiempo, aunque sin llegar a recuperarse los niveles basales de fosforilación (Figura 36B).



**Figura 36. Regulación de los niveles de expresión de la fosfatasa DUSP1 por el receptor de BDNF.** Las neuronas granulares se estimularon a los tiempos indicados con BDNF (50 ng/mL). Se cuantificó la variación a lo largo del tiempo de las proteínas DUSP1 (A) y pERK1,2 (B) mediante experimentos de Western Blot. En la imagen se muestran las bandas representativas de estos datos para cada proteína y un diagrama de la cuantificación de los niveles de proteína a lo largo del tiempo. Los valores obtenidos se normalizaron con los niveles de GAPDH correspondientes para cada experimento. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$  respecto al control no estimulado.

La regulación de DUSP1 por BDNF se ha podido comprobar también por experimentos de inmunocitofluorescencia. En la Figura 37 se aprecia una distribución de DUSP1 a nivel nuclear, aunque también se encuentra a nivel citoplasmático, y cuya intensidad aumenta con el tiempo de estimulación con BDNF, desde 30 minutos hasta 2 horas, de igual manera que se había visto en los experimentos de Western Blot. El marcaje de los niveles de fosforilación de ERK1,2 se encuentra muy elevado a 30 minutos de estimulación, y disminuye paulatinamente a 1-2 horas. Además, el pico máximo de pERK1,2 es muy potente en el núcleo, lo que indica que BDNF podría estar regulando la respuesta génica dependiente de la señalización de ERK1,2.

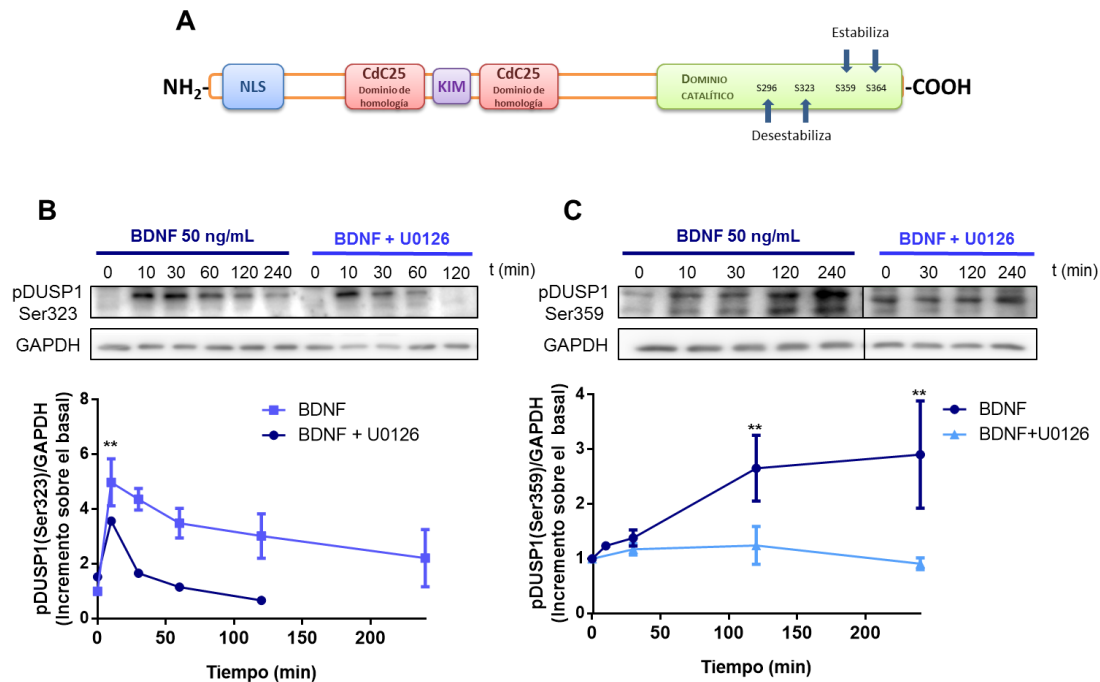


**Figura 37. El BDNF aumenta los niveles de expresión de la fosfatasa DUSP1 en neuronas granulares.** Las células sembradas en cubreobjetos tratados con Poli-D-Lisina fueron estimuladas con BDNF (50 ng/ml) a los tiempos indicados, a continuación, fueron fijadas y se realizó la inmunocitofluorescencia. Las imágenes son representativas de cada condición y muestran el inmunomarcaje de la proteína DUSP1 (rojo) y de pERK1,2 (verde), obtenidos mediante el empleo de anticuerpos específicos. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las barras de escala representan 50  $\mu$ m.

### 3.4. El BDNF promueve la fosforilación de DUSP1 de manera dependiente de ERK1,2.

Como se ha comentado anteriormente, la fosfatasa DUSP1 proporciona un buen ejemplo de los múltiples niveles de regulación a los que pueden estar sometidas las fosfatasas DUSPs (Caunt y Keyse, 2013). Teniendo en cuenta que BDNF promueve un aumento sostenido de los niveles de DUSP1, éste podría ser explicado, bien por una mayor inducción del gen *Dusp1*, o por la puesta en marcha de ciertas modificaciones postraduccionales que implicarían la estabilización de la proteína y aumentarían su vida media. En ambos procesos ERK1,2 podría jugar un papel determinante, de acuerdo con la potente activación de la señalización de ERK1,2 mediada por BDNF. La fosforilación en distintos residuos de DUSP1 dependiente de ERK1,2 ha sido ampliamente descrita en la literatura (Brondello *et al.*, 1999; Jeanneteau *et al.*, 2010). Como se muestra en la Figura 38A, DUSP1 puede ser fosforilada en distintos residuos de serina, por las proteínas quinasas ERK1,2. Dos de estos residuos, Ser296 y Ser323, marcan la proteína haciéndola más susceptible de ubiquitinización y degradación vía proteasoma. Por otro lado, la fosforilación en los residuos Ser359 y Ser364 promueven la estabilización de la proteína, haciéndola más resistente a la degradación. A fin de comprobar si se producía esta regulación por fosforilación en nuestro modelo de estudio, se emplearon dos anticuerpos fosfo-específicos de DUSP1: uno que reconocía el residuo Ser323 fosforilado y otro que reconocía la fosforilación en el residuo Ser359. Ambos anticuerpos sólo dieron señal específica cuando se realizaron incubaciones con

la neurotrofina BDNF, pero no mostraron ninguna actividad frente a las incubaciones con BzATP (Figura 38B, 38C).



**Figura 38. La estimulación del receptor TrkB con BDNF induce la fosforilación de DUSP1 de manera dependiente de ERK1,2.** (A) Esquema representativo de la estructura y la localización de algunos residuos implicados en la estabilización y desestabilización de proteína fosfatasa DUSP1. (B, C) Las neuronas granulares fueron preincubadas en presencia y ausencia del inhibidor de MEK, U0126 (10µM) durante 30 minutos, y posteriormente estimuladas con BDNF (50 ng/mL) a distintos tiempos, como se ha indicado anteriormente. Se detectaron los niveles de DUSP1 fosforilada en los residuos Ser323 (B) y Ser359 (C) en experimentos de Western Blot mediante el uso de anticuerpos fosfo-específicos. Se muestran las imágenes con las bandas representativas de los resultados obtenidos y el diagrama correspondiente a los valores obtenidos normalizados respecto a GAPDH. Los datos han sido representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\* $p < 0,01$  respecto al control no estimulado.

Respecto a lo observado por Western Blot a nivel de fosforilación de la proteína DUSP1, la estimulación a distintos tiempos con BDNF promovió un patrón contrario de fosforilación de DUSP1 para ambos residuos. Se observaba un incremento rápido de la fosforilación en el residuo Ser323 a los 10-30 minutos, que va disminuyendo lentamente sin recuperarse los niveles basales, con un patrón similar al observado anteriormente para ERK1,2 (Figura 38A). Este punto máximo de fosforilación coincidía con la caída inicial de la proteína DUSP1 que se observaba a 10 minutos de estimulación con BDNF, y podría ser debido a una rápida etapa de degradación. En el caso del residuo Ser359 se observó un incremento lento pero constante en los niveles de fosforilación, que se correspondía de manera exacta con el patrón observado en los niveles de proteína DUSP1 totales (Figuras 38B y 36A). En ambos casos, estas fosforilaciones fueron revertidas por las preincubaciones realizadas con el inhibidor U0126 (10 µM) durante 30 minutos, lo que sugiere que estos procesos son dependientes de ERK1,2. Si bien, en el caso de la fosforilación en la Ser323, no se anulaba completamente con el inhibidor a tiempos cortos, pudiendo existir la contribución de otra proteína quinasa distinta en este efecto. Se probaron otros inhibidores de proteínas quinasas, como el inhibidor de PI3K, LY294002 y el inhibidor de PKC, GF-I. Ninguno de ellos previno la fosforilación de

DUSP1 en Ser323. (resultados no mostrados). La fosforilación de DUSP1 no se ha observado cuando se realizaron estimulaciones con BzATP, quizás por no producirse ningún cambio en la estabilización de la proteína, al tratarse de un patrón de expresión de DUSP1 más transitorio que coincide con el pico de inducción transcripcional.

De estos resultados se puede concluir que tanto el receptor P2X7 como el de BDNF convergen en la regulación de la fosfatasa DUSP1 en neuronas granulares de cerebelo. En el caso de la neurotrofina BDNF, el aumento en los niveles de expresión de DUSP1 es el resultado de la contribución de dos mecanismos diferentes, la inducción transcripcional y la estabilización de la proteína.

Es necesario resaltar que, si bien los receptores P2X7 y de EGF compartían mecanismo de regulación de la fosfatasa DUSP6, el EGF no tuvo ningún efecto significativo en la regulación de DUSP1. Asimismo, BDNF no parecía estar acoplado a la regulación de la fosfatasa DUSP6 en las neuronas granulares de rata. Estas diferencias encontradas a nivel de la regulación de las proteínas fosfatasas DUSP1 y DUSP6 por los receptores P2X7 y Trks estarían indicando que las implicaciones fisiológicas podrían ser muy diferentes en las neuronas granulares.

Puesto que muchas de las herramientas experimentales disponibles para promover el silenciamiento o sobreexpresión de los genes *Dusp1* y *Dusp6* estaban disponibles para el modelo de ratón, se decidió realizar cultivos de neuronas granulares de ratón con el objeto de comprobar si se reproducían los mismos patrones de regulación de las proteínas fosfatasas por los receptores P2X7 y Trks. Principalmente, se hizo hincapié en el estudio de DUSP1 ya que había exhibido un patrón muy diferente de regulación por los receptores P2X7 y de BDNF.

#### **4. Regulación de las fosfatasas de especificidad dual por los receptores P2X7 y de BDNF en las neuronas granulares de cerebelo de ratón.**

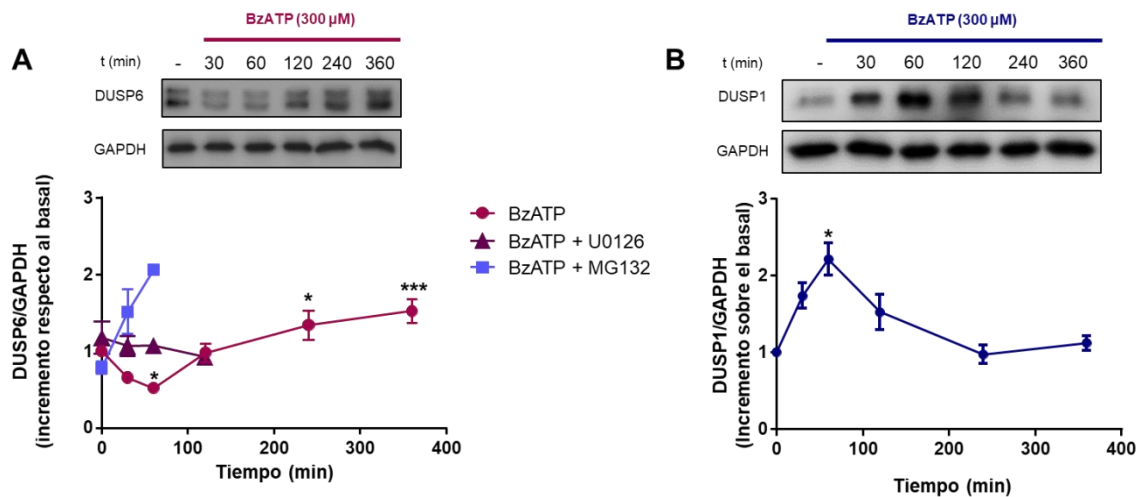
##### **4.1. Regulación de la expresión de DUSP6 y DUSP1 por el receptor P2X7 en neuronas granulares de ratón P2rx7-EGFP.**

Nuestro laboratorio disponía de ratones transgénicos que expresan la GFP (proteína verde fluorescente) bajo el promotor del receptor P2X7, y que han sido muy utilizados para estudios de distribución y localización de este receptor (ratones P2rx7-EGFP) (resultados en vía de publicación). En cultivos de neuronas granulares de cerebelo obtenidos de crías de estos animales, comprobamos que el receptor P2X7 se estaba expresando en las neuronas, ya que se detectaba una débil fluorescencia verde que aumentaba a medida que el cultivo se diferenciaba y maduraba, incluso en ausencia de inmunomarcaje con anticuerpos específicos para GFP. Por lo que pasamos a realizar estudios de regulación de las proteínas fosfatasas tras la estimulación de este receptor.

Cuando se realizaron las primeras estimulaciones con BzATP, fue necesario incrementar la concentración hasta 500  $\mu$ M, ya que la  $pEC_{50}$  descrita para el receptor P2X7 murino C57BL/6 ( $4.02 \pm 0.02$ ) es más alta que en rata ( $5.01 \pm 0.04$ ) (Donnelly-Roberts y Jarvis, 2007), y así asegurar que la concentración que estábamos utilizando era la concentración efectiva. En estas condiciones, observamos que el BzATP era

tóxico para las células en los primeros 30 minutos estimulación. Por este motivo, las incubaciones se realizaron con BzATP 500  $\mu$ M durante 15 minutos, se retiró el medio de incubación y se añadió medio de cultivo de nuevo hasta completar los tiempos requeridos, a fin de evitar que se produjera la muerte de estas neuronas por estimulaciones muy prolongadas con BzATP.

Respecto al receptor P2X7, se reprodujeron los resultados observados en rata, y se obtuvo un patrón similar de regulación de las fosfatasa DUSP6 y DUSP1 al estimular las neuronas granulares con el agonista BzATP (Figura 39). Como era esperable, para la fosfatasa DUSP6 se obtuvo un patrón bifásico de regulación. Además, el descenso inicial de los niveles de DUSP6 promovido por el receptor P2X7 se revertía con el tratamiento con el inhibidor de MEK, U0126, y con el inhibidor del proteasoma, MG132 (Figura 39A). De igual manera, la estimulación del receptor P2X7 producía un aumento transitorio de los niveles de expresión de DUSP1 cuyo máximo se alcanzaba a 1 hora (Figura 39B).



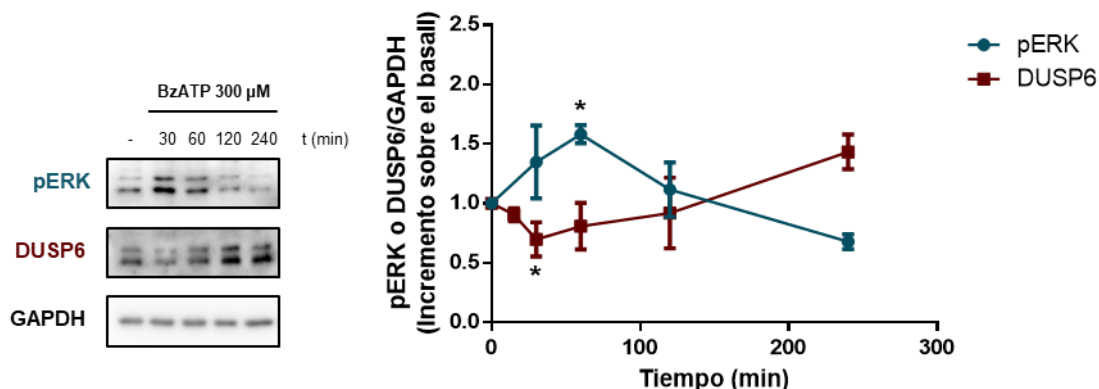
**Figura 39. Regulación de la expresión de DUSP6 y DUSP1 por el receptor P2X7 en neuronas granulares de ratón P2rx7-EGFP.** Las células fueron preincubadas en presencia y ausencia del inhibidor de MEK, U0126 (10  $\mu$ M) y del proteasoma MG132 (10  $\mu$ M) durante 30 minutos y, a continuación, se estimularon con BzATP. Tras la estimulación de las neuronas granulares de cerebelo de ratón transgénico con BzATP (500  $\mu$ M) durante 15 minutos, se retiró el medio y se reemplazó por medio de cultivo nuevo hasta los tiempos indicados en la figura. Los niveles de las fosfatasa se detectaron mediante Western Blot. Se muestran las imágenes con las bandas obtenidas de un experimento representativo de los resultados y el diagrama correspondiente a los valores de DUSP6 (A) y DUSP1 (B) normalizados con respecto a GAPDH. Los datos han sido representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  respecto al control no estimulado.

Debido a la baja disponibilidad de los ratones P2rx7-EGFP, continuamos los estudios con cultivos de neuronas granulares obtenidas de ratones de la cepa C57BL/6. Aunque en este modelo las estimulaciones con BzATP no resultaban tan tóxicas, decidimos continuar con las incubaciones realizadas durante 15 minutos, dada la alta concentración empleada del agonista nucleotídico y para evitar cambios en la viabilidad celular.



#### 4.2. Regulación de la expresión de DUSP6 y DUSP1 por los receptores P2X7 y TrkB en neuronas granulares de ratón C57BL/6.

Las estimulaciones con BzATP en neuronas granulares de cerebelo de ratón C57BL/6 presentaron patrones similares a los obtenidos en cerebelo de rata y en ratón P2rx7-EGFP, en cuanto a la regulación de las fosfatasa DUSP1 y DUSP6. Como era de esperar el receptor P2X7 regulaba de manera bifásica la fosfatasa DUSP6 en el modelo murino C57BL/6, y seguía un patrón inverso al observado en los niveles de fosforilación de ERK1,2 (Figura 40).

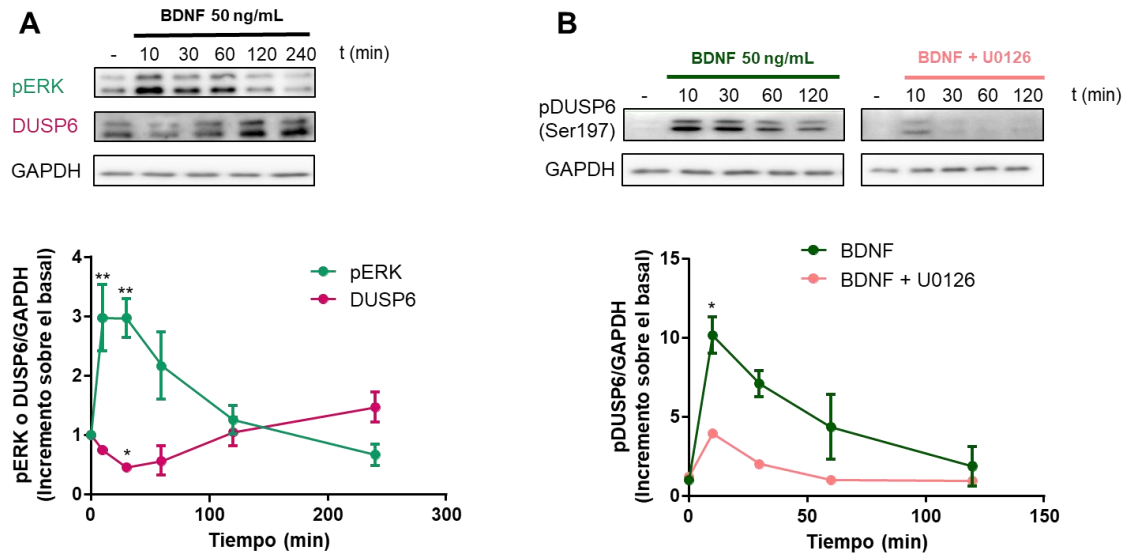


**Figura 40. Regulación de la expresión de DUSP6 por el receptor P2X7 en neuronas granulares de ratón C57BL/6.** Las células fueron tratadas con BzATP (500 µM) durante 15 minutos a distintos tiempos y, a continuación, se les retiró el medio de estimulación y se restauró el medio de cultivo hasta el momento de obtener el lisado, como se indica en el texto. En las imágenes se muestran las imágenes con las bandas obtenidas en un experimento representativo de los resultados y el diagrama los valores de pERK1,2 y DUSP6 normalizadas frente a los valores de GAPDH correspondientes. Los datos representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \* $p < 0,05$  respecto al control no estimulado.

A continuación, examinamos el efecto de las estimulaciones con BDNF 50 ng/mL en los cultivos de neuronas granulares de ratón C57BL/6. Como punto a destacar en primer lugar, se observaron grandes diferencias en cuanto a lo que se había observado en rata con la fosfatasa DUSP6. En las neuronas granulares de rata, la estimulación con BDNF no había dado un resultado claro en la regulación de los niveles de DUSP6. En cambio, en el modelo de ratón, el BDNF fue capaz de promover cambios en los niveles de la proteína DUSP6, siguiendo el mismo patrón bifásico que el observado con BzATP y EGF en rata y con BzATP en ratón. Además, la activación de ERK1,2 fue igual de rápida (10 minutos) y potente que la observada en el modelo de rata (Figura 41A). Postulándose este mecanismo de regulación bifásica de la señalización de DUSP6 como un mecanismo universal, que funciona para distintas señales extracelulares y en distintos modelos celulares.

En segundo lugar, una diferencia destacable en cuanto a la regulación de DUSP6 por BDNF con respecto a lo observado para el receptor P2X7 fue que en neuronas de ratón sí se pudo observar la fosforilación de DUSP6 en el residuo Ser197 de manera muy potente, que era mediada por estimulaciones cortas de BDNF, y que subía hasta 10 veces por encima del basal. El patrón de fosforilación de la fosfatasa era coincidente con el obtenido para la activación de ERK1,2, produciéndose un incremento rápido y transitorio de los niveles de fosforilación de DUSP6 entre 10 y 30 minutos de estimulación con BDNF, que, en cambio, se correspondía de manera inversa con la

disminución en los niveles totales de DUSP6 (Figura 41B). A estimulaciones más largas con BDNF, la fosforilación en Ser197 disminuía con el tiempo en paralelo a la recuperación de los niveles de DUSP6. Este efecto fue parcialmente revertido por preincubaciones de 30 minutos con U0126 10  $\mu$ M, proponiéndose ERK1,2 como responsable de la fosforilación en este residuo que marca DUSP6 para su degradación proteasomal (Figura 41B).

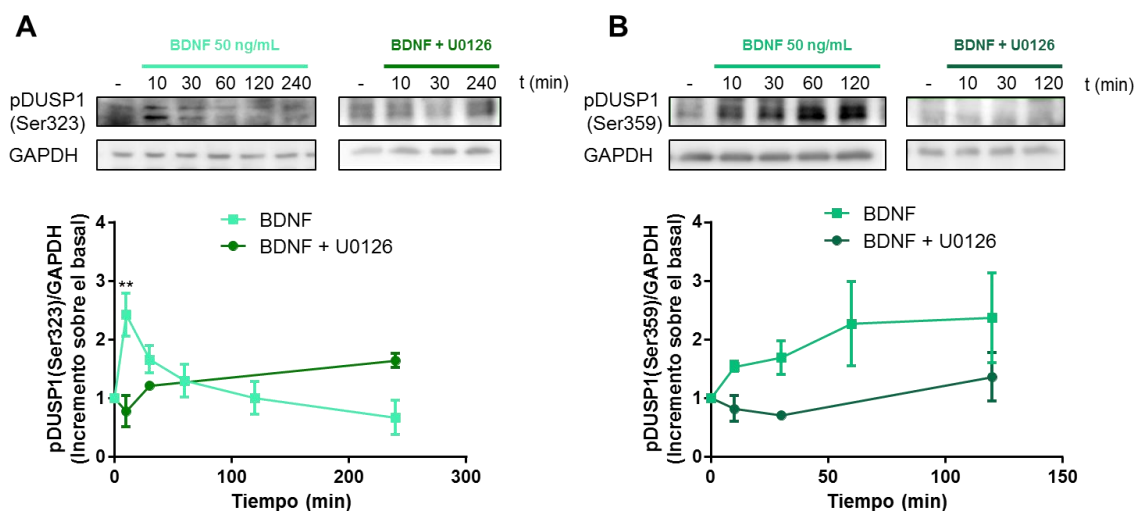


**Figura 41. El BDNF modula los niveles de la fosfatasa DUSP6 en neuronas granulares de cerebelo de ratón C57BL/6.** Las células fueron preincubadas en presencia y ausencia del inhibidor de MEK, U0126 (10  $\mu$ M) durante 30 minutos previos a la adición de BDNF (50 ng/mL) a distintos tiempos, como se ha indicado anteriormente para los experimentos realizados en rata. En las imágenes se muestran las imágenes con las bandas obtenidas en un experimento representativo y los diagramas correspondientes a DUSP6 y pERK1,2, (A) y a pDUSP6 Ser197 (B), normalizadas frente a los valores de GAPDH. Los datos han sido representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  respecto al control no estimulado.

Cuando se iniciaron los experimentos con neuronas granulares de ratón C57BL/6, ya no se disponía de los anticuerpos específicos para la detección de la proteína DUSP1, debido al cese de producción de éstos por parte de la casa comercial. Por lo tanto, únicamente se pudieron analizar los niveles de las formas fosforiladas de DUSP1 en los residuos Ser323 y Ser359.

De acuerdo con lo obtenido previamente en rata, en el caso de la Ser323 se observó un patrón de fosforilación con un incremento rápido y transitorio a tiempos cortos de estimulación con BDNF (10 minutos) y una recuperación de los niveles basales de manera paulatina, siendo este efecto completamente revertido por la preincubación durante 30 minutos con U0126 (10  $\mu$ M) (Figura 42A). En cuanto a la fosforilación en la Ser359, esta se producía de manera lenta y escalonada durante la estimulación a distintos tiempos con BDNF y también era revertida por la preincubación con U0126 (Figura 42B). Cabe señalar de nuevo que la fosforilación en el residuo Ser359 es indicativo de la estabilización de la proteína DUSP1, y va en paralelo con los niveles de DUSP1 total, aunque en este caso sólo se ha podido corroborar en los experimentos realizados en neuronas granulares de rata.





**Figura 42. El BDNF modula los niveles de fosforilación de la fosfatasa DUSP1 en neuronas granulares de cerebelo de ratón C57BL/6.** Las células fueron preincubadas en presencia y ausencia de U0126 (10  $\mu$ M) durante 30 minutos antes de la adición de BDNF (50 ng/mL) a distintos tiempos. Se muestran las imágenes con las bandas representativas obtenidas en un experimento tipo y los diagramas de los valores de pDUSP1 Ser323 (A) y pDUSP1 Ser359 (B), normalizados frente a los valores de GAPDH correspondientes. Los datos han sido representados como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 3 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  respecto al control no estimulado.

Estos resultados obtenidos tanto en neuronas granulares de rata como de ratón, nos indican que la regulación bifásica de DUSP6 es un mecanismo universal compartido por muchos mediadores extracelulares, factores de crecimiento, neurotrofinas y nucleótidos, y que se ha podido reproducir en un modelo neuronal.

Por otra parte, en las neuronas granulares se encuentran diferencias significativas en la modulación ejercida por los receptores de nucleótidos y neurotrofinas respecto a la fosfatasa DUSP1, lo que sugiere que su función fisiológica puede ser muy diferente.

#### 4.3. Implicaciones fisiológicas de DUSP1/MKP-1 en la maduración neuronal.

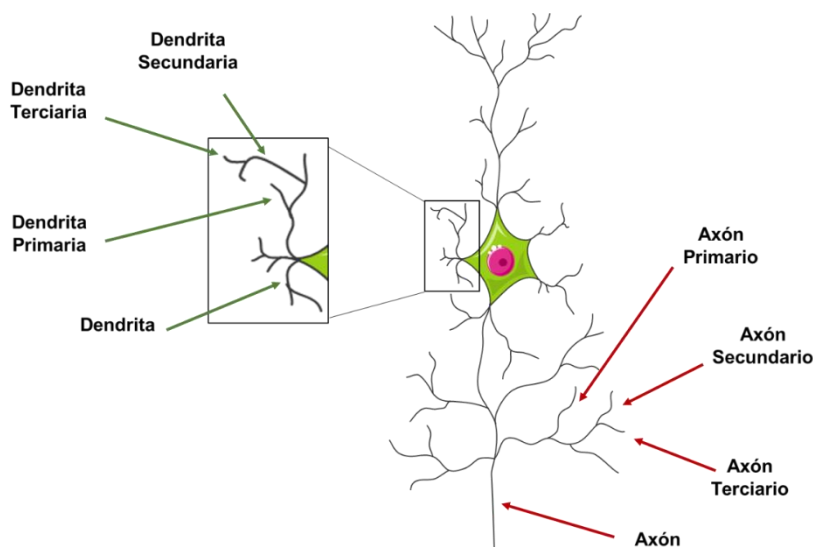
Existían datos en la bibliografía que apuntaban hacia la implicación de los receptores P2X7 y de BDNF en la regulación de la diferenciación neuronal. Previamente, ya se había descrito el papel del receptor P2X7 como regulador negativo del crecimiento y ramificación axonal en neuronas de hipocampo (Díaz-Hernández *et al.*, 2008) y en la neuritogénesis en células de neuroblastoma murino N2A (Gómez-Villafuertes *et al.*, 2015). Respecto al papel del BDNF, había sido identificado como regulador positivo de las ramificaciones axonales en neuronas corticales de ratón, y además, este efecto se había visto que estaba mediado a través de DUSP1/MKP-1 (Jeanneteau *et al.*, 2010; Jeanneteau y Deinhardt, 2011). En base a estos precedentes y a la distinta regulación temporal de DUSP1/MKP-1 por parte de estos receptores, nos planteamos estudiar si los receptores P2X7 y de BDNF podrían estar ejerciendo sus efectos sobre la arborización dendrítica y la ramificación axonal a través de la regulación de la proteína fosfatasa DUSP1/MKP-1 en las neuronas granulares.

Estos estudios se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Jeanneteau, en el Institute de Génomique Fonctionnelle (CNRS, INSERM, Montpellier), como actividad investigadora

de una estancia predoctoral de tres meses de duración. Se realizaron con cultivos primarios de neuronas granulares de ratón C57BL/6 con el mismo protocolo utilizado en nuestro laboratorio. Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos tratados con Poli-D-Lisina, y a una densidad muy baja, adecuada para evaluar las diferencias en la arborización dendrítica y la ramificación axonal a lo largo de los días en cultivo y sometidas a los distintos tratamientos.

A fin de comprobar cuál es el papel de DUSP1/MKP-1 en la diferenciación y maduración de las neuronas granulares de cerebelo, se decidió llevar a cabo su silenciamiento con los plásmidos que previamente había empleado el Dr. Jeanneteau en neuronas corticales (Jeanneteau *et al.*, 2010). Para ello las neuronas granulares se transfectaron con los plásmidos de silenciamiento control (shRNA scrambled) y con el silente de *Dusp1* (shRNA MKP-1) al día siguiente de su cultivo, a 1 DIV. Las incubaciones se realizaron a distintos DIV con BzATP (300  $\mu$ M) y BDNF (50 ng/mL) durante 16 horas, concretamente a 3 DIV y a 6 DIV, para procesar las células a 4 DIV y 7 DIV, respectivamente. A los días indicados, las células se fijaron y se realizaron las tinciones de inmunocitofluorescencia con el objeto de analizar los cambios en la longitud y el número de prolongaciones celulares.

Para realizar las medidas de las prolongaciones celulares, éstas se denominaron como se indica en la siguiente imagen (Figura 43).



**Figura 43.** Imagen esquemática en la que se representa la nomenclatura con la que se han definido cada una de las prolongaciones neuronales representadas en las ulteriores gráficas.

Para estos experimentos se midió tanto la longitud como el número de cada una de las prolongaciones de axones y dendritas, tanto en las neuronas transfectadas con el plásmido control como en las transfectadas con el plásmido que contenía el ARN para el silenciamiento de *Dusp1*. Estas medidas se realizaron en aquellas células que presentaban fluorescencia verde por efecto de la expresión de la GFP, que expresan únicamente las células que han captado tanto el plásmido control como el de silenciamiento de *Dusp1*. Y además solo se tuvieron en cuenta las células que resultaron marcadas positivamente con  $\beta$ -III tubulina, una proteína del citoesqueleto específica de neuronas, para eliminar del análisis las células que hubieran captado el plásmido y que pudieran ser células gliales.

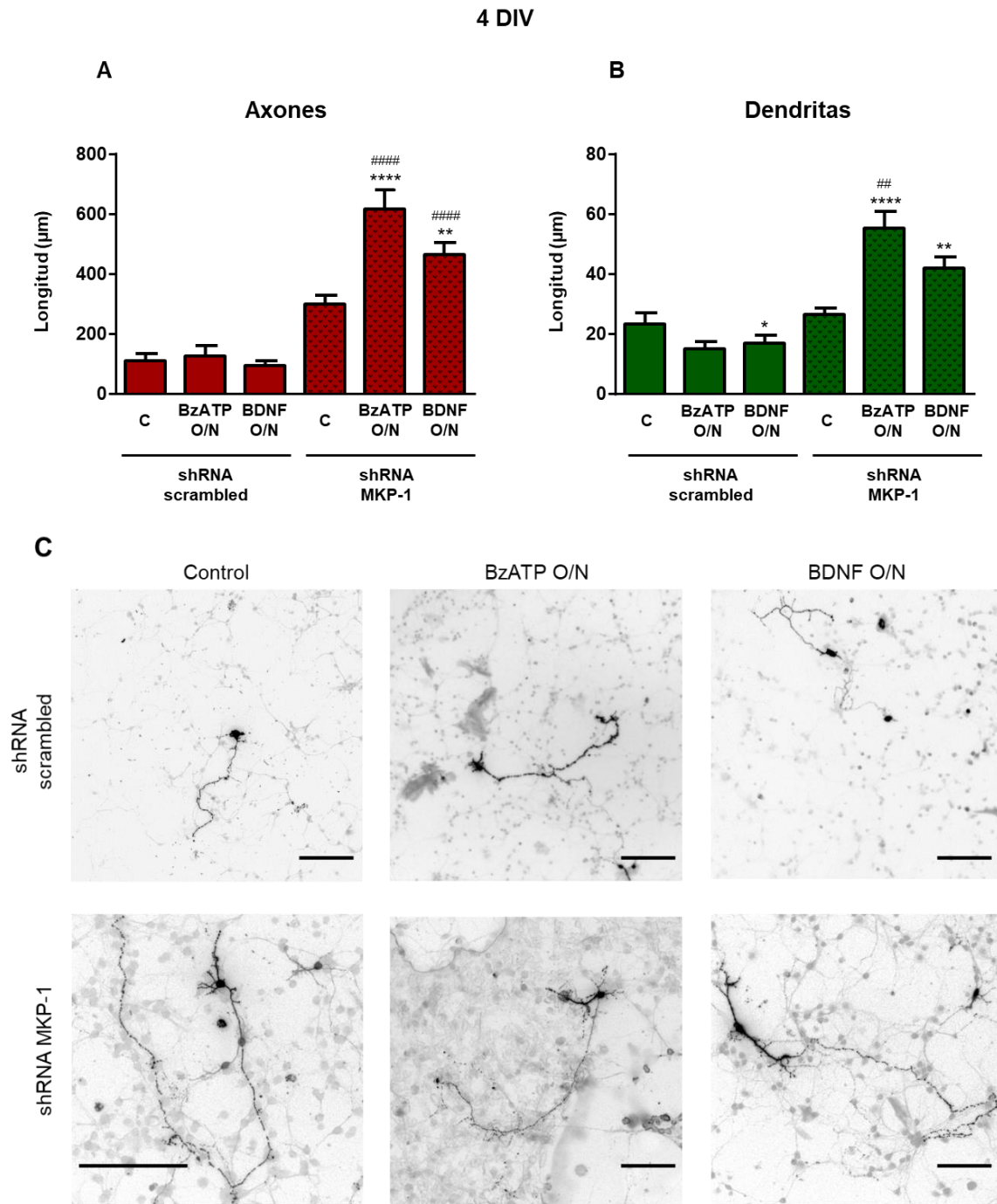
#### 4.3.1. Efecto del silenciamiento de *Dusp1* sobre la longitud y arborización dendrítica y ramificación axonal de las neuronas granulares a 4 DIV.

Las células empezaron a fijarse a 4 días *in vitro* para tener la certeza de que el silenciamiento de *Dusp1* fuera completo y no quedase proteína remanente en las células. La longitud de los axones y de las dendritas no se vio modificada significativamente por el tratamiento con BzATP y BDNF, si bien se observó un ligero descenso, sobre todo a nivel de las dendritas, con la estimulación del BDNF. Sin embargo, al silenciar DUSP1/MKP-1, no solo se produjo un incremento muy significativo de más de 3 veces de la longitud axónica, sino que, además, se observó un incremento de hasta 4 y 6 veces en condiciones de estimulación con BDNF y BzATP, respectivamente. En cuanto a la longitud dendrítica, el silenciamiento de *Dusp1* no tuvo ningún efecto por sí solo, pero en cambio, revirtió el efecto negativo de BzATP y BDNF, promoviendo aumentos de 2-3 veces con respecto a las condiciones basales (Figura 44).

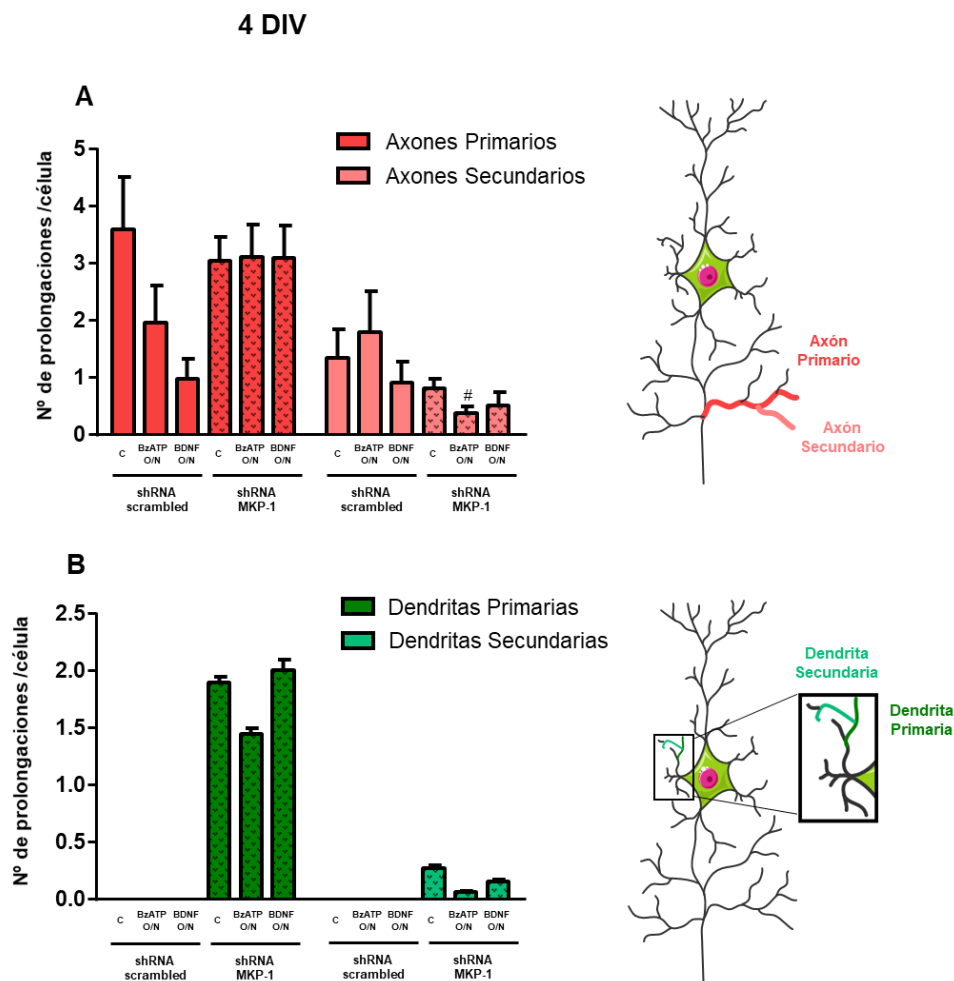
A estadios tempranos del cultivo, parece que DUSP1/MKP-1 podría controlar negativamente la longitud dendrítica y axonal, y este efecto desaparecería con su silenciamiento, condiciones en las que se desinhibirían y se manifestarían los efectos de BzATP y BDNF. Estos resultados indican que estos efectos sobre la longitud dendrítica y axonal dependen de la proteína DUSP1/MKP-1.

A partir de los experimentos anteriores también fue posible evaluar el grado de arborización dendrítica y ramificación axonal, realizando el conteo del número de ramificaciones primarias, secundarias y terciarias (estas últimas no se han incluido en el análisis presentado). En cuanto a la ramificación axónica, se vio disminuida con los distintos tratamientos, siendo más pronunciada por el tratamiento con BDNF en los axones primarios, si bien no se alcanzó la significación estadística con los datos procesados hasta el momento. El silenciamiento de *Dusp1* en este período del cultivo a 4 DIV no tuvo ningún efecto sobre las ramificaciones primarias de los axones, aunque sí disminuyó las secundarias. Sin embargo, fue destacable que la menor emisión de ramificaciones primarias mediada por BzATP y BDNF se vio bloqueada por completo cuando se silenció DUSP1/MKP-1, indicando que la inhibición en la ramificación axónica promovida por BzATP y BDNF estaría mediada por DUSP1/MKP-1 (Figura 45).

En lo que respecta a la arborización dendrítica, en ausencia de estimulación las dendritas no se encuentran ramificadas a los estadios tempranos del cultivo de 4 DIV, y los tratamientos con los agonistas BzATP y BDNF tampoco inducen su ramificación. Sin embargo, el silenciamiento de *Dusp1* promueve la aparición de ramificaciones primarias y secundarias en las dendritas de manera prominente, no pareciendo ejercer ningún efecto significativo las estimulaciones de los receptores P2X7 y de BDNF (Figura 45). De nuevo, a raíz de estos resultados podemos decir, que además de influir en la longitud dendrítica y axonal, DUSP1/MKP-1 también estaría actuando como freno a una arborización dendrítica aberrante, y mediando la disminución de la ramificación axonal inducidas por BzATP y BDNF.



**Figura 44. Efecto del silenciamiento de *Dusp1* en la longitud de axones y dendritas de neuronas granulares a 4DIV.** Las neuronas granulares se transfectaron a 1 DIV con el plásmido control (shRNA scrambled) y el plásmido con el silente de *Dusp1* (shRNA MKP-1). Las células fueron tratadas a 3 DIV con BzATP (300 µM) o con BDNF (50 ng/mL) durante toda una noche (O/N, overnight), antes de fijar las células a 4 DIV. La longitud de las prolongaciones se midió empleando la extensión del programa Image J, denominada Neuron J, como se describe en Materiales y Métodos. Los diagramas A y B muestran la longitud de los (A) axones y (B) dendritas. (C) Imágenes de inmunocitofluorescencia (en negativo) representativas de neuronas marcadas positivamente con GFP y β-III-tubulina que fueron seleccionadas para realizar las medidas. La barra de escala representa una medida de 125 µm. Los datos se han representado como la media ± SEM de, al menos, 2 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos en los que se analizaron aproximadamente 30 células por condición. \*\*\*\*p<0,0001; \*\*p<0,01; \*p<0,05 respecto al control no estimulado; y #####p<0,0001; ##p<0,01 frente al control o estimulación correspondiente en el shRNA scrambled.



**Figura 45. Efectos del silenciamiento de *Dusp1* en la ramificación axonal y dendrítica de neuronas granulares a 4DIV.** En la imagen se observan los cambios en el valor medio del número de (A) axones primarios y secundarios y (B) dendritas primarias y secundarias que se encuentran por célula unitaria. Las células fueron tratadas con BzATP (300  $\mu$ M) o con BDNF (50 ng/mL) durante toda una noche (O/N, unas 16 horas), antes de fijar las células. El número de prolongaciones se midió empleado la extensión del programa Image J, denominada Neuron J. Los datos se han representado como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 2 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos en los que se analizaron aproximadamente 30 células por condición. # $p < 0,1$  frente al control o tratamiento correspondiente en el shRNA scrambled.

#### 4.3.2. Efecto del silenciamiento de *Dusp1* sobre la longitud y arborización dendrítica y ramificación axonal de las neuronas granulares a 7 DIV.

Respecto a los resultados obtenidos a 7 días *in vitro*, la longitud de los axones se ha incrementado aproximadamente 3 veces desde los estadios más tempranos 4 DIV hasta el estadio más diferenciado a 7 DIV (Figura 46A). Sin embargo, no se observan grandes cambios en lo que a la longitud axónica se refiere, en condiciones de estimulación con BzATP y BDNF.

Es necesario señalar que, en el caso del silenciamiento de *Dusp1*, la longitud de los axones se ve reducida con los tratamientos a 7 DIV en comparación con la longitud de los axones de las células tratadas y silenciadas a 4 DIV, pasando de una longitud aproximada de 600  $\mu$ m en el caso del BzATP y de, aproximadamente, 500  $\mu$ m en el caso del BDNF, a una media de unos 450  $\mu$ m en ambos casos a 7 DIV, viéndose así

reducida la longitud axonal al tratar las células silenciadas con BzATP o con BDNF a 7 días de cultivo.

Algo similar ocurre con las dendritas, cuya longitud aumenta 2 veces a 7 DIV respecto a 4 DIV, mientras que con el silenciamiento de *Dusp1* se pierde este efecto. Por otra parte, el crecimiento promovido por los tratamientos en las células carentes de DUSP1/MKP-1 parece verse revertido a los 7 DIV, disminuyendo su longitud de unas 60  $\mu\text{m}$  a unos 40  $\mu\text{m}$  en el caso del BzATP y de unos 50  $\mu\text{m}$  a unos 30  $\mu\text{m}$  en el caso del BDNF. Es decir que DUSP1/MKP-1 sería necesaria para el mantenimiento de ese aumento de longitud dendrítica en condiciones basales en el proceso de maduración. Pero en cambio, frena la propensión de BzATP y BDNF para aumentar la longitud a 7 DIV (Figura 46B).

Estos resultados en su conjunto nos indican que el silenciamiento de *Dusp1* a estadios más diferenciados produce la retracción de los axones y dendritas, deteniendo su crecimiento y ramificación, e impidiendo los efectos mediados por BzATP y BDNF.

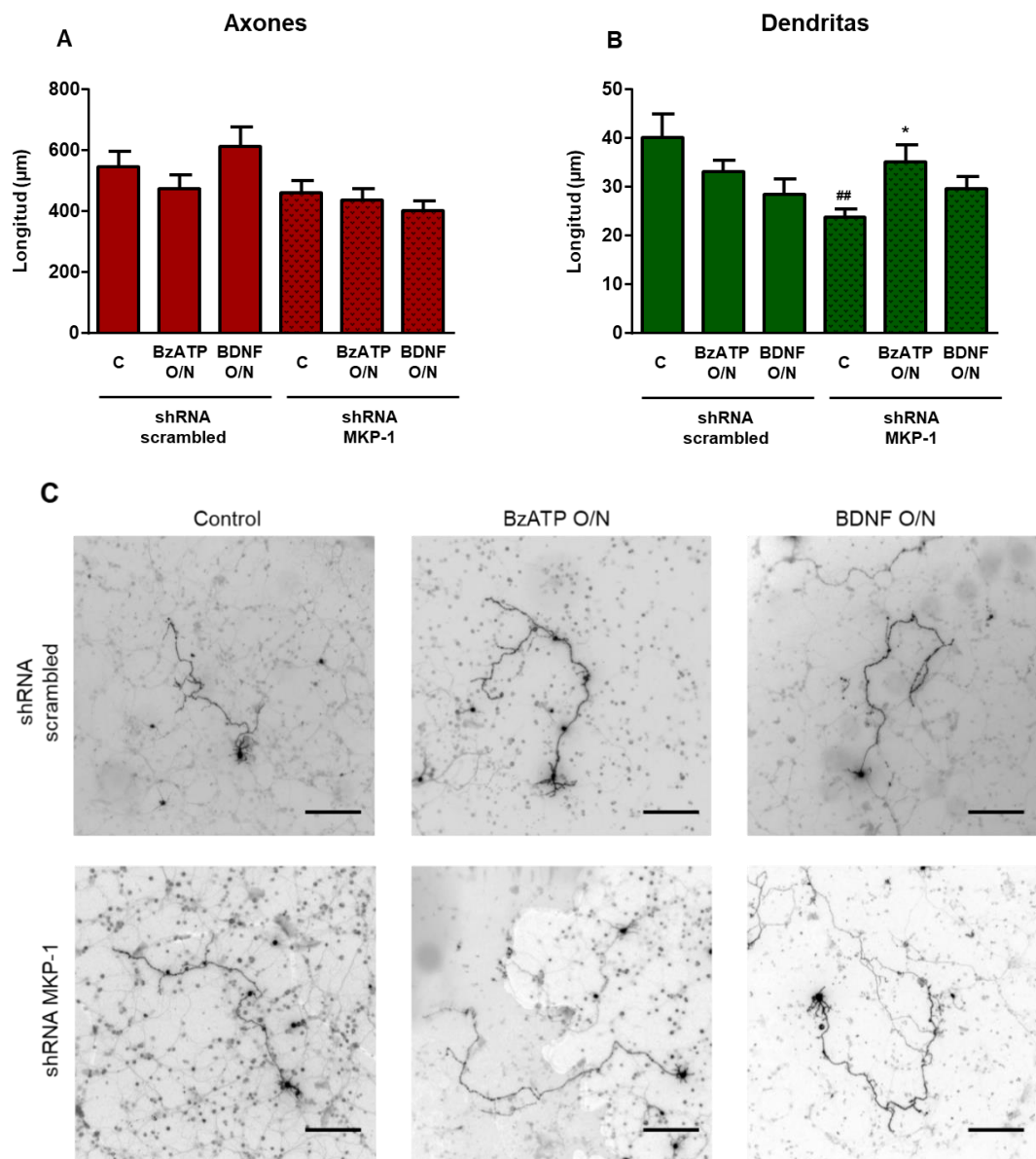
Cuando se midieron el número de ramificaciones a 7 DIV, se observó un efecto contrapuesto al que se había observado a 4 DIV, ya que tanto BzATP como BDNF parecían tener un efecto positivo sobre la ramificación axonal y dendrítica. La ramificación axónica a 7 DIV se encontró incrementada con los tratamientos con BzATP y con BDNF, siendo más pronunciada con BDNF en los axones primarios, y con el agonista del receptor P2X7, BzATP, en el caso de los axones secundarios. Sin embargo, en cuanto a las dendritas, el BzATP fue capaz de incrementar significativamente el número de dendritas primarias y secundarias a 7 días de cultivo, no ejerciendo ningún efecto sobre estas el agonista BDNF (Figura 47).

De manera sorprendente, en ambos casos, estos incrementos mediados por BzATP y BDNF sobre la ramificación dendrítica y axonal se vieron impedidos al silenciar la expresión de DUSP1/MKP-1, tanto en prolongaciones primarias como secundarias. Conviene resaltar que el efecto de BDNF parece reducirse sólo a nivel de las ramificaciones axónicas, mientras que BzATP estaría incrementando tanto la ramificación axónica como la arborización dendrítica (Figura 47).

El hecho de que el silenciamiento de *Dusp1* por sí mismo no tuviera ningún efecto sugiere que esta fosfatasa ya sería dispensable a estos estadios más maduros del cultivo, a 7 DIV. Pero que, cualquier aumento en su expresión mediada por señales extracelulares, nucleótidos o neurotrofinas, tendría un efecto positivo sobre el crecimiento de las ramificaciones axonales o dendríticas. Puesto que el silenciamiento también produce una disminución del número de ramificaciones de axones y dendritas promovidos por BzATP y BDNF a 7 DIV con respecto a 4 DIV.



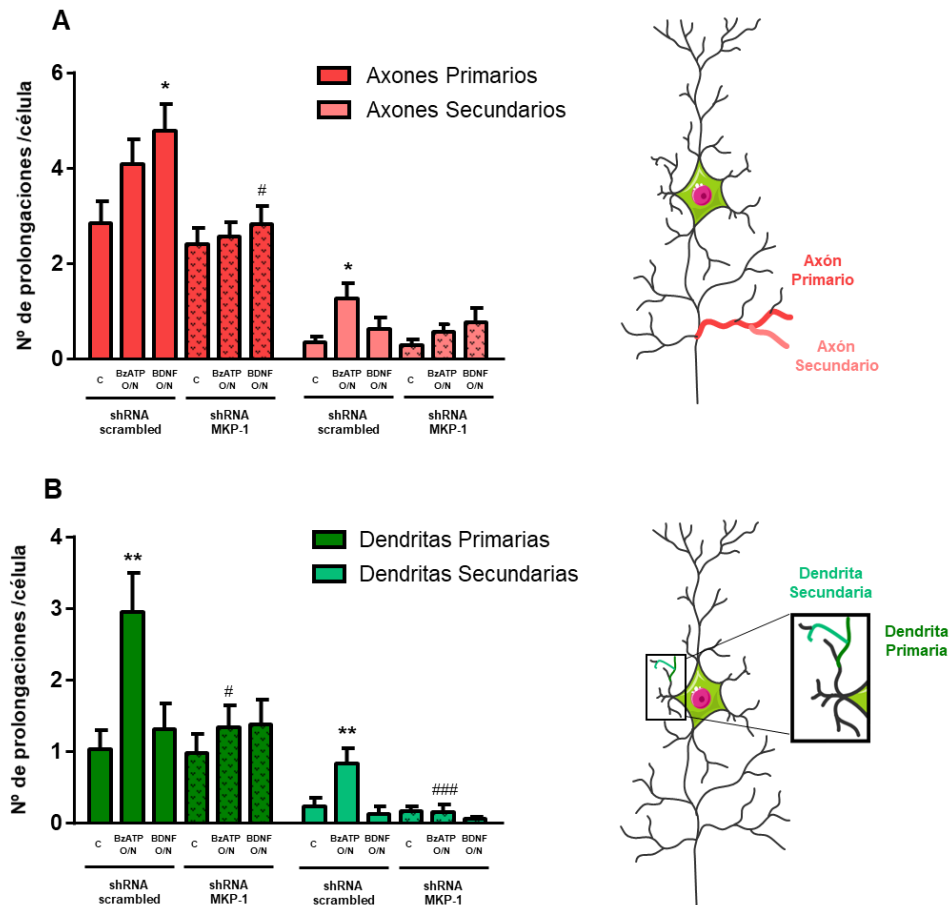
7 DIV



**Figura 46. Efectos del silenciamiento de *Dusp1* en la longitud de axones y dendritas de neuronas granulares a 7DIV.** Las neuronas granulares se transfectaron a 1 DIV con el plásmido control (shRNA scrambled) y el plásmido con el silente de *Dusp1* (shRNA MKP-1). Las células fueron tratadas a 6 DIV con BzATP (300 μM) o con BDNF (50 ng/mL) durante unas 16 horas (O/N), antes de fijarlas. La longitud de las prolongaciones se midió empleando la extensión del programa Image J, denominada Neuron J. Los diagramas A y B muestran la longitud de los (A) axones y (B) dendritas. (C) Imágenes de inmunocitofluorescencia (en negativo) representativas de neuronas marcadas positivamente con GFP y β-III tubulina. La barra de escala representa una medida de 125 μm. Los datos se han representado como la media ± SEM de, al menos, 2 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos en los que se analizaron aproximadamente 40 células por condición. \* $p < 0,05$  respecto al control shRNA MKP-1 no estimulado, y  $^{##}p < 0,01$  frente al control shRNA scrambled.



7 DIV



**Figura 47. Efectos del silenciamiento de *Dusp1* en la ramificación axonal y dendrítica neuronas granulares a 7DIV.** En la imagen se observan los cambios en el valor medio del número de (A) axones primarios y secundarios y (B) dendritas primarias y secundarias que se encuentran por célula unitaria. Las células fueron tratadas con BzATP (300  $\mu$ M) o con BDNF (50 ng/mL) durante toda una noche (O/N), unas 16 horas), antes de fijar las células. El número de prolongaciones se midió empleado la extensión del programa Image J, denominada Neuron J. Los datos se han representado como la media  $\pm$  SEM de, al menos, 2 experimentos independientes llevados a cabo en distintos cultivos en los que se analizaron aproximadamente 40 células por condición. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  respecto al control no estimulado; y ### $p < 0,001$ ; # $p < 0,1$  frente al control o estimulación correspondiente en el shRNA scrambled.



## ***DISCUSIÓN***



En este trabajo hemos abordado el estudio de las proteínas fosfatasa DUSP6 y DUSP1 en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo. Hemos demostrado cómo varían los niveles endógenos de estas fosfatasa por distintos mediadores extracelulares, especialmente por los nucleótidos y la neurotrofina BDNF. Las proteínas ERK1,2, sustratos preferente de la fosfatasa DUSP6 y uno de los posibles sustratos de DUSP1, son las principales responsables de su regulación, representando un mecanismo de retroalimentación negativa para controlar los niveles de activación espacio-temporal de estas MAP quinasas.

## 1. Variaciones en los niveles de expresión de las fosfatasa DUSP1 y DUSP6 en la diferenciación del cultivo de las neuronas granulares.

Nos centramos en el estudio de las proteínas fosfatasa DUSP1 y DUSP6 porque parecían que eran las más expresadas en modelos neurales y para las que se habían identificado múltiples niveles de regulación. Además, proporcionaban ejemplos de fosfatasa capaces de inactivar la señalización de ERK a nivel nuclear y citosólico. Mediante los análisis a nivel de proteína y ARN mensajero a distintos DIV se pudo comprobar que ambas fosfatasa experimentaban variaciones en su expresión durante la diferenciación y maduración del cultivo de las neuronas granulares, indicando que los picos de expresión de estas fosfatasa podrían ser indicativos de etapas clave en la diferenciación. Los niveles de la proteína DUSP6 alcanzaban su máximo en torno a 6-10 DIV, presentando un patrón coincidente con el observado para el receptor P2X7 y para el nivel de activación de ERK. En cambio, los niveles de DUSP1 parecían mostrar un patrón inverso, disminuyendo lentamente sus niveles a lo largo de la maduración y del desarrollo del cultivo. Efectivamente, se ha descrito que los niveles de expresión de DUSP1 y DUSP6 varían y aumentan durante la diferenciación de distintas poblaciones neuronales en respuesta a neurotrofinas, como el NGF. Ésta fue la primera neurotrofina que se relacionó con la modulación de la expresión de la fosfatasa DUSP6 en células PC12 de feocromocitoma murino (Muda *et al.*, 1996). DUSP6 participaba en un mecanismo de retroalimentación negativa de la señalización de las ERK, ya que la inducción transcripcional de DUSP6 era dependiente de ERK (Muda *et al.*, 1996). Además, de acuerdo con nuestros resultados, el patrón de expresión que siguen DUSP1 y DUSP6 en respuesta a distintos factores, como NGF y ácido retinoico, es muy diferente en los distintos estadios del proceso de diferenciación, ya que están regulando la señalización de ERK en distintos compartimentos intracelulares (Reffas y Schlegel, 2000; Waetzig y Herdegen, 2003). Cuando los niveles de DUSP6 y pERK disminuyen en la fracción citoplasmática, DUSP1, junto con pERK, pueden ser detectados y acumulados en el núcleo (Reffas y Schlegel, 2000).

Respecto al patrón observado en los niveles de ARN mensajero, ambas fosfatasa muestran mayores niveles en las primeras etapas de la maduración. Parece que el gen *Dusp6* muestra máximos niveles al inicio del cultivo de las neuronas granulares y va decayendo con la maduración, cuestión que, aparentemente, no concuerda con lo observado en proteína. Posiblemente esto sea debido a una estabilización en los niveles de proteína dependiente de la señalización de ERK. Lo contrario ocurre con la fosfatasa *Dusp1*, en este caso, los niveles de expresión del gen incrementan ligeramente a lo largo del cultivo, no traducándose en mayores niveles de proteína. Posiblemente debido a que los elevados niveles de ERK1,2 fosforiladas estén activando su transcripción a la vez que promueven la degradación de la proteína por fosforilación (Caunt y Keyse, 2013). Este patrón observado es consistente con los estudios ya comentados en la línea

celular P19 diferenciadas a neuronas con ácido retinoico, la expresión *dusp6* tiene lugar antes y más fuertemente, mientras que los picos de transcripción *dusp1* son transitorios y disminuyen ligeramente durante el curso de la diferenciación. Los cambios observados en el ARN mensajero de *Dusp1* parecen no corresponderse con un incremento en los niveles de proteína, de manera similar a lo observado en neuronas granulares (Reffas y Schlegel, 2000).

Las variaciones en los patrones de expresión de las fosfatasa DUSP1 y DUSP6 a lo largo del desarrollo también se han constatado *in vivo*. El papel de DUSP6 como modulador de la señalización de ERK en el desarrollo ha sido bien descrito en distintos modelos animales, habiendo sido relacionada con el desarrollo del sistema nervioso y la embriogénesis, actuando como diana del morfógeno FGF en modelos murinos y de pez cebra (Dickinson *et al.*, 2002; Eblaghie *et al.*, 2003; Echevarria *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006; Partanen, 2007). De hecho, se ha demostrado que DUSP6 juega un importante papel en el desarrollo del cerebelo, modulando la señalización de ERK promovida por FGF durante el desarrollo del pez cebra (Liao *et al.*, 2013) y en el desarrollo global del ratón. Habiéndose descrito que mutaciones en el gen *dusp6* pueden resultar en pérdida de audición, craniostosis, dwarfismo esquelético e incluso llegar a ser letal en etapas postnatales, de manera similar a lo que ocurre cuando existen alteraciones en la función del receptor de FGF (Li *et al.*, 2007).

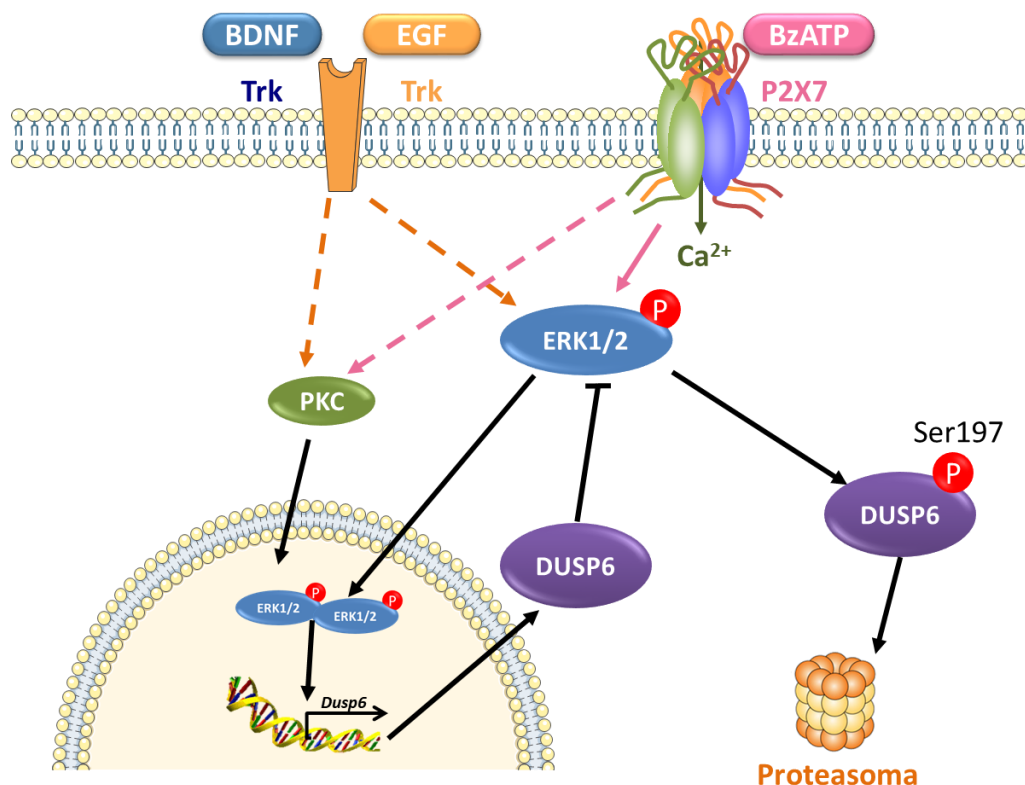
## **2. Regulación bifásica de la fosfatasa de especificidad dual DUSP6 por los receptores P2X7 y Trks en neuronas granulares de cerebelo.**

Por medio de los estudios llevados a cabo en la proteína fosfatasa DUSP6 se ha podido demostrar su presencia en las neuronas granulares de cerebelo de rata y de ratón, así como su modulación bifásica por parte de los receptores P2X7, de EGF y BDNF, este último ejerciendo su efecto exclusivamente en el caso de la neuronas granulares de cerebelo de ratón, pero sin mostrar efecto en rata.

La estimulación con el agonista específico del receptor P2X7, BzATP, y con los factores tróficos EGF y BDNF, han demostrado ejercer una modulación de los niveles de la proteína fosfatasa DUSP6 que sigue una cinética bifásica. Esta regulación implica una degradación de DUSP6 en fases tempranas de estimulación de los receptores, y que supone un mecanismo de retroalimentación positiva de las quinasas ERK1,2 para amplificar y prolongar su propio nivel de activación sobre sus sustratos citosólicos (que pueden ser ciertas proteínas quinasas y proteínas del citoesqueleto). Se continúa con una segunda fase en la que se recuperan los niveles de la proteína DUSP6, permitiendo su actuación como modulador negativo de la activación de ERK1,2, y devolviéndola a sus niveles basales de activación. Las proteínas ERK1,2 están implicadas en todas las etapas de la modulación bifásica de los niveles de DUSP6, ya que la activación de ERK1,2 es necesaria tanto para la degradación, como para la recuperación de los niveles basales de la fosfatasa, dando lugar a un bucle de retroalimentación negativa y asegurando su propia desactivación. La relevancia de los datos obtenidos se basa en que esta regulación bifásica se comporta como un mecanismo universal compartido por diversos tipos celulares, primeramente descrito en líneas celulares como cultivos primarios de células de células endoteliales de aorta, pero que además opera en respuesta a distintas señales extracelulares, generalmente mitógenos, pero ahora también lo hemos demostrado para los receptores de nucleótidos en cultivos primarios

de células de origen neural (Jurek *et al.*, 2009; Ndong *et al.*, 2012; Queipo *et al.*, 2017). De modo que se puede concluir que tanto el receptor P2X7 como los receptores de EGF y de BDNF, son elementos clave capaces de ejercer una fina modulación de la señalización de las ERK 1,2 a través de la regulación de los niveles de la fosfatasa DUSP6 (Figura 48).

Figura 48. Representación esquemática de la regulación bifásica de DUSP6 por los receptores P2X7,



**de EGF y de BDNF en neuronas granulares.** Los receptores P2X7, de EGF y de BDNF promueven una regulación bifásica de la expresión de la fosfatasa selectiva para ERK, DUSP6. A corto plazo, esta señalización promueve una degradación vía proteasomal. Las MAPK, ERK1,2 podrían estar marcando a DUSP6 para su degradación mediante fosforilación. Las estimulaciones a tiempos largos inducen la expresión génica de *Dusp6*, de nuevo de manera dependiente de ERK1,2, para terminar de manera eficiente la señalización de ERK.

Tanto en el modelo de las neuronas granulares de cerebelo de rata como de ratón, la proteína DUSP6 se degrada via proteasoma de manera rápida tras la estimulación con BzATP o con los factores tróficos. La vida media de DUSP6 tras estimulaciones cortas con ambos agonistas, BzATP y EGF, es similar, de acuerdo con datos previos obtenidos en células de aorta (Jurek *et al.*, 2009). Este hecho también se ha visto corroborado en astrocitos cerebelosos de rata (Queipo *et al.*, 2017).

Otro aspecto interesante de la degradación de DUSP6 en respuesta a BzATP y a los factores tróficos es la necesidad de la activación de ERK1,2, ya que la degradación parece verse atenuada al evitar la activación de ERK1,2, mediante la adición al cultivo del inhibidor de MEK1, U0126. De este modo, ERK1,2 participan en su propia autorregulación a través de la degradación de DUSP6, probablemente marcándola para su degradación. En nuestro modelo de estudio, sólo se ha identificado el residuo Ser197 como punto de marcaje para la degradación de DUSP6 en las neuronas granulares de cerebelo de ratón cuando se estimularon con BDNF, pero no en rata ni con el empleo de los otros agonistas, BzATP y EGF. En cambio, la estimulación de los receptores P2X7 y de EGF sí promovían la fosforilación de DUSP6 en Ser197 en los astrocitos de



cerebelo de rata. Indicando que diferencias en el perfil de activación de ERK promovidas por los distintos receptores, si el pico es más mantenido o más transitorio, o si es de mayor o menor magnitud, pueden dar lugar a distintos procesos de fosforilación que se traduzcan en respuestas específicas. La menor potencia en la activación de la señalización de ERK por P2X7 y EGF en neuronas granulares puede no ser suficiente para fosforilar de manera efectiva la DUSP6.

Este tipo de regulación por degradación de DUSP6 también se ha observado tras la estimulación con factores de crecimiento en modelos de sobreexpresión de la proteína en respuesta a mitógenos, Ras, y en modelos con una expresión inducible de DUSP6 (Zeliadt *et al.*, 2008). De acuerdo con esto, los residuos Ser159 y Ser197, ubicados en el extremo N-terminal de DUSP6 fueron las primeras dianas de fosforilación identificadas para mTOR y ERK1,2, respectivamente, promoviendo su degradación en respuesta a suero en fibroblastos que expresaban ectópicamente DUSP6 (Marchetti *et al.*, 2005; Bermudez *et al.*, 2008). En células endoteliales en las que se sobreexpresaba ectópicamente el receptor de PDGF, DUSP6 se veía sometida a una rápida degradación similar a la observada en las neuronas granulares y astrocitos. Los residuos Ser174 y Ser300 se identificaron como las dianas de la fosforilación de ERK1,2, siendo responsables del reclutamiento de enzimas ubiquitina-ligasa y de la degradación de DUSP6 (Jurek *et al.*, 2009). De modo que no podemos descartar puntos de fosforilación alternativos de DUSP6 en las neuronas granulares de rata y de ratón por parte del receptor P2X7 y de EGF, aún no identificados, que marquen la fosfatasa para su degradación. También se ha descrito la degradación proteolítica de DUSP6 mediada por caspasa-3, de manera dependiente de ERK, aunque esto sólo ocurre en condiciones proapoptóticas. Si bien podría ser otro mecanismo que contribuyera a su degradación en caso de una elevada actividad de ERK1,2, en nuestras condiciones no se tiene evidencia de que tenga lugar la fragmentación de la proteína DUSP6 (Cejudo-Marin *et al.*, 2012; Brondello *et al.*, 1999; Lin y Yang, 2006). A partir de estos datos existe la posibilidad de que la degradación de DUSP6 promovida por P2X7 y EGF en neuronas granulares se produzca por la fosforilación dependiente de ERK en otros residuos que no se han analizado, o también, que pudiera tener lugar por la participación de otras proteínas quinasas distintas de ERK.

En cuanto a la recuperación de los niveles de DUSP6, debe tenerse en cuenta que, aunque el gen *Dusp6* no es un gen de expresión temprana, su expresión ocurre de manera rápida y transitoria, observándose un incremento de sus niveles de ARNm tras 1-2 horas de estimulación con BzATP o EGF, aconteciendo este hecho en la misma ventana temporal que la observada para otros factores de crecimiento (Zeliadt *et al.*, 2008; Jurek *et al.*, 2009). La transcripción del *Dusp6* parece ser consecuencia de la activación de ERK1,2, ya que, al inhibir las quinasas encargadas de su fosforilación, MEK, con el inhibidor U0126, se frena parcialmente el incremento de la transcripción tanto con BzATP como con EGF, bloqueando incluso basalmente la expresión del gen. Si bien es sabido que la expresión de *Dusp6* puede estar modulada por los reguladores transcripcionales Ets-1 y Ets-2, los cuales a su vez son dianas de ERK1,2 (Ekerot *et al.*, 2008; Jurek *et al.*, 2009), para que esta transcripción se vea completamente abolida se precisa de la combinación de U0126 junto con GF-I, un inhibidor de PKC. En efecto, el receptor P2X7 puede promover la activación de ERK1,2 por PKC en células neuronales (Tsao *et al.*, 2013) al igual que ocurre con el factor de crecimiento EGF (Corbit *et al.*, 2000). En cambio, en las neuronas granulares la activación de ERK por el receptor P2X7 se produce de manera dependiente de CaMKII (Ortega *et al.*, 2011). No se puede descartar que la inhibición de PKC ejerza su efecto por una vía alternativa distinta y paralela a la activación de ERK1,2, siendo éste mecanismo el que parece más probable,

ya que es necesaria la inhibición de ambas proteínas para frenar la transcripción de *Dusp6*, principalmente en el caso del EGF.

Los estudios llevados a cabo con el inhibidor transcripcional Actinomicina D, sustentan firmemente la hipótesis de un incremento de la expresión génica de *Dusp6* debido a una inducción transcripcional y no a una estabilización del ARN mensajero del gen en respuesta a BzATP y EGF. Ejemplos de la estabilización del ARN mensajero de DUSP6 se han descrito en células XXX, en las que el transcrito *Dusp6* está estabilizado por el factor inducible por hipoxia HIF-1 a fin de incrementar sus niveles en caso de hipoxia de manera dependiente de ERK1,2 (Referencia Gimond). También se ha descrito la estabilización del transcrito por TTP (Tristetraprolina) y por PUM2 (Pumilio homólogo 2) en la línea celular embrionaria de riñón humano HEK293 (Bohn *et al.*, 2018).

En cualquier caso, se produce un desfase temporal entre el incremento de expresión del gen y la recuperación de los niveles de proteína de DUSP6 que contribuye al mantenimiento de la señalización de ERK durante más tiempo, sugiriendo que la estimulación de los receptores P2X7 en neuronas aumentan la señalización citoplasmática de ERK1,2 durante periodos más largos. El significado fisiológico de la dicotomía entre una activación transitoria o sostenida de ERK1,2 radica en el modelo de estudio y el compartimento subcelular en el que se activen estas quinasas. De este modo, activaciones dilatadas en el tiempo de ERK, pueden promover la supervivencia de macrófagos en condiciones de hipoxia, aunque en este caso, la regulación a la baja de la actividad de DUSP6 es requerida para tal efecto, modulando el balance entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas (Nyunoya *et al.*, 2005). Sin embargo, y por el contrario, en otros modelos de estudio, una activación sostenida de ERK puede ejercer efectos deletéreos, sobre todo cuando se acumula en el núcleo, como es el caso de las neuronas granulares de cerebelo sometidas a estímulos proapoptóticos (Subramaniam *et al.*, 2005), de manera similar a lo que se observa en neuronas corticales murinas tras la adición del agente alquilante del ADN, cisplatino, que promueve una pérdida de actividad de DUSP6 (Gozdz *et al.*, 2008). La regulación de la actividad citosólica de ERK1,2 es también crucial en la diferenciación celular (Camps *et al.*, 1998).

Finalmente, hemos podido confirmar que las proteínas ERK1,2 citosólicas son el sustrato fisiológico de DUSP6 en las neuronas granulares, de acuerdo con los estudios realizados con el inhibidor BCI. Por otra parte, el efecto de BCI también se traduce en un aumento de la fosforilación de p38, sobre todo a nivel nuclear. Aunque la fosforilación de p38 podría ser secundaria a la señal de ERK, BCI también podría estar inhibiendo DUSP1, que también tendría como sustrato a p38 en las neuronas granulares. En efecto, el BCI es un inhibidor alostérico de la actividad de las fosfatasa DUSP1 y DUSP6 que se ha empleado en múltiples estudios, principalmente de desarrollo cardíaco en pez cebra (Molina *et al.*, 2009; Missinato *et al.*, 2018). Esta molécula ha supuesto una excelente herramienta farmacológica para estudiar la función de estas fosfatasas en distintas patologías, principalmente para entender los mecanismos de resistencia al tratamiento quimioterapéutico en cáncer. De hecho, se ha visto que puede resultar tóxico para las células e inducir apoptosis mediante la generación de estrés oxidativo (Shin *et al.*, 2018). En las neuronas granulares de cerebelo de rata, resulta tóxico a partir de una concentración de 10  $\mu$ M en tratamientos con duración superior a 1 hora, indicando que se trata de células muy sensibles a la inhibición de estas fosfatasas. Y por tanto, se puede decir que el mantenimiento de unos niveles de

expresión adecuados de las fosfatasa DUSP1 y DUSP6 sería importante para la supervivencia de las neuronas granulares.

En conclusión, nuestros estudios han contribuido a confirmar este mecanismo bifásico de regulación DUSP6 como mecanismo universal que es común para distintos factores de crecimiento y neurotrofinas, y ahora también descrito por primera vez para el receptor nucleotídico P2X7. Este mecanismo es muy importante ya que indica que las proteínas ERKs regulan su propia señalización a través de la modulación de la expresión de DUSP6, garantizando unos correctos niveles de activación de ERK1,2 que permitan a las células responder a subsiguientes estimulaciones. Sobre todo, teniendo en cuenta que la intensidad y duración final de la señal de ERK1,2, va a determinar finalmente el destino celular. De hecho, la caída inicial de DUSP6 potencia la actividad de ERK en el citosol sobre sus sustratos citosólicos que pueden ser proteínas quinasas o proteínas del citoesqueleto, indicando que la señal de ERK a este nivel podría ser importante para la remodelación del citoesqueleto y procesos de diferenciación. Por otra parte, la terminación de la señal de ERK, promovida por la expresión génica de DUSP6, ayudaría a regular el balance entre apoptosis y supervivencia, al evitar los efectos deletéreos de una sobreactivación mantenida de ERK en el tiempo.

### **3. Estudios de regulación de la proteína fosfatasa de especificidad dual DUSP1 por los receptores P2X7 y de BDNF en neuronas granulares de cerebelo.**

La proteína fosfatasa DUSP1 se ha definido como una fosfatasa inducible de localización nuclear y que muestra la misma especificidad de sustrato por cualquiera de las MAPKs, ERK, p38 y JNK. DUSP1 es una de las fosfatasas mejor caracterizada en cuanto a los mecanismos de regulación se refiere. Además sobre DUSP1 se conoce más acerca de sus posibles funciones en sistema nervioso, y se ha descrito que está presente en neuronas, astrocitos y microglia (Collins *et al.*, 2013; Jeanneteau y Deinhardt, 2011; Hui *et al.*, 2016). Como DUSP6, DUSP1 podría estar regulada por distintos mediadores extracelulares en las neuronas granulares.

En las neuronas granulares de cerebelo de rata y ratón, el agonista nucleotídico BzATP y el BDNF resultaron actuar como inductores transcripcionales de *Dusp1*, mientras que el EGF no mostró ningún efecto. Esta inducción transcripcional se producía de manera rápida, a partir de los 30 minutos de estimulación con ambos efectores, de manera coherente con el hecho de que *Dusp1* sea un gen de expresión temprana (Horita *et al.*, 2010). Si bien es necesario remarcar, que se encontró un valor de vida media mayor al esperado y similar al de una fosfatasa constitutiva, como DUSP6. Esta inducción transcripcional se producía de manera clara a través de la señalización de ERK1,2, aunque en el caso del BzATP también parecía estar involucrada la quinasa p38, ya que las dos quinasas ERK y p38 se encuentran activadas por la estimulación del receptor P2X7 a los tiempos a los que se propicia la expresión de DUSP1, y la inhibición de ambas bloquea por completo su inducción transcripcional. Esto estaría de acuerdo con la inducción de *Dusp1* dependiente de p38 promovida por BDNF en neuronas corticales (Collins *et al.*, 2013).

Mientras que BzATP promueve una inducción más rápida y transitoria del gen, BDNF da lugar a una inducción más sostenida en el tiempo y más potente que en el caso de la estimulación del receptor P2X7. Se ha descrito que los factores estabilizadores del ARN mensajero HuR y NF90 (Factor Nuclear 90) podrían estabilizar el transcrito de

*Dusp1* e incrementar su tiempo de vida media (Galban *et al.*, 2008). Sin embargo, los estudios realizados con Actinomicina D confirmaron que el incremento del transcrito del gen se debía de una inducción transcripcional, y no a la estabilización del ARN mensajero. Por el contrario, BzATP y BDNF parecían tener un ligero efecto desestabilizador del gen *Dusp1* y bajar su vida media, sobre todo en el caso de BDNF. En este mismo sentido, la preincubación con el inhibidor de la transcripción no solo bloqueó la expresión génica de *Dusp1* si no que, junto con los agonistas P2X7 y TrkB, agudizó su degradación. Esto podría deberse a la activación de micro-ARNs de interferencia que desestabilicen al gen, como el micro-ARN-101, que se ha visto que promueve la degradación de *Dusp1* en la patología de Lupus Eritematoso Sistémico, contribuyendo a una respuesta inmune aberrante (Yang *et al.*, 2013), o como el caso del micro-ARN-200c, cuya inhibición induce la expresión de *Dusp1* en cardiomiocitos hipertróficos (Singh GB, 2017).

A nivel de proteína DUSP1 se encontraron grandes diferencias tanto en neuronas granulares de rata como de ratón en cuanto a la regulación ejercida por BzATP y BDNF. El agonista nucleotídico produjo un incremento transitorio en los niveles de la proteína DUSP1 que se veía abolido por las preincubaciones con el inhibidor de la fosforilación de MEK, U0126. Además, el pico de expresión de DUSP1 promovido por BzATP coincidía con el patrón de activación de ERK, pero no con el de la proteína p38, ya que la fosforilación de p38 era más sostenida en el tiempo. Estos resultados concuerdan con el patrón transitorio mostrado para la inducción transcripcional del gen de *Dusp1* y apuntan a que éste es un proceso preferentemente dependiente de ERK. Si bien, y contrariamente a lo que habíamos observado para DUSP6, no se apreciaba un patrón inverso entre los niveles de fosforilación de las MAPK ERK y p38 y los niveles de la proteína DUSP1. Esto podría deberse a que esté ejerciendo su actividad fosfatasa a nivel nuclear y este efecto no sea apreciable a nivel global.

Las estimulaciones del receptor TrkB con la neurotrofina BDNF dieron lugar a un patrón de expresión de DUSP1 completamente distinto, ya que el incremento a lo largo del tiempo se produjo de manera paulatina hasta las 6 horas de estimulación. Este incremento de DUSP1 es mucho mayor que el que se produce con BzATP y se corresponde con un patrón inverso de activación de ERK1,2. DUSP1 podría estar desfosforilando en este caso a ERK1,2 tanto a nivel nuclear, como citoplasmático. No obstante, en experimentos de inmunocitofluorescencia, se confirmó que la señal de ERK en el núcleo disminuía de forma paralela al aumento de la distribución nuclear de DUSP1 con el tiempo de estimulación de BDNF. Por lo tanto, estos resultados indican que el sustrato de DUSP1 en las neuronas granulares podría ser más probablemente ERK y no p38, como se intuía en los experimentos realizados con BCI. El aumento de p38 dependiente del tratamiento con BCI podría ser secundario a la activación de ERK. No obstante, aunque BDNF no regulaba los niveles de DUSP6 en rata, sí lo hacía en ratón, y probablemente esté regulando a través de DUSP6 los niveles de ERK1,2 a nivel citoplasmático, y a través de DUSP1 los niveles de ERK a nivel nuclear. Como se ha demostrado en trabajos anteriores, p38 podría ser la diana preferente de la fosfatasa DUSP2 en las neuronas granulares, ya que en condiciones proapoptóticas, la disminución en los niveles de DUSP2 se correlacionaba perfectamente con un aumento de la forma fosforilada de p38 en el núcleo (Morente *et al.*, 2014).

En el caso del BDNF, el incremento de la fosforilación de ERK1,2 coincidía con los niveles de expresión del gen *Dusp1*. Sin embargo, el incremento en los niveles de proteína DUSP1 está ligeramente desfasado respecto a lo observado a nivel génico. De hecho, hay una primera fase de caída rápida de la proteína DUSP1 a tiempos de

estimulación muy cortos, y el aumento de proteína se extiende mucho más allá del pico de su inducción transcripcional. Para comprobar por qué se podría estar produciendo este fenómeno decidimos comprobar si la proteína podría estar siendo desestabilizada o degradada a tiempos cortos de estimulación con el agonista BDNF. Se han descrito cuatro puntos susceptibles de ser fosforilados por ERK1,2 en DUSP1, como se ilustró anteriormente en la Figura 49. La fosforilación en Ser296 y Ser323 marcan DUSP1 para su degradación, mientras que la fosforilación en Ser359 y Ser364, estabilizan la proteína, previniendo su degradación (Brondello *et al.*, 1999; Lin y Yang, 2006). El balance entre los procesos de fosforilación en estos residuos se refleja en los niveles de expresión finales de DUSP1.

En las neuronas granulares, se observó un incremento en la fosforilación de DUSP1 en la Ser323 a tiempos cortos de estimulación con BDNF, que iba disminuyendo con el tiempo. Este resultado podría sustentar la hipótesis de que el desfase entre el incremento de ARN mensajero y el de la proteína pueda deberse a una primera etapa de desestabilización de DUSP1 por su fosforilación en Ser323. Por otra parte, pese a que este residuo susceptible de fosforilación está descrito como específico para ERK1,2, no se evitó completamente con las preincubaciones con el inhibidor de la activación de ERK1,2, U0126 en las neuronas granulares de rata, aunque sí en las de ratón. Esto podría deberse a la implicación de distintas quinasas en ambos modelos celulares, como la PKC $\delta$ , que podría estar dirigiéndola a su degradación en el modelo de rata a través de la vía ubiquitina-proteasoma, como ha sido descrito en una línea células de hipocampo y en neuronas corticales durante la excitotoxicidad inducida por glutamato (Choi *et al.*, 2006).

Además de su fosforilación en Ser323, el marcaje de DUSP1 en la Ser359, que implica una estabilización de la proteína, muestra un incremento a partir de las 2 horas de estimulación con BDNF, viéndose en este caso bloqueado por completo dicho incremento con la preincubación con U0126, tanto en el modelo de rata como en el ratón. Aunque es cierto que el bloqueo de la fosforilación con U0126 podría deberse tanto a la inactividad de ERK1,2 para fosforilar DUSP1 como para inducir su transcripción, se demuestra que este residuo parece ser clave en la estabilización de la proteína, al coincidir su patrón de fosforilación con el patrón de incremento de los niveles de expresión de la proteína DUSP1.

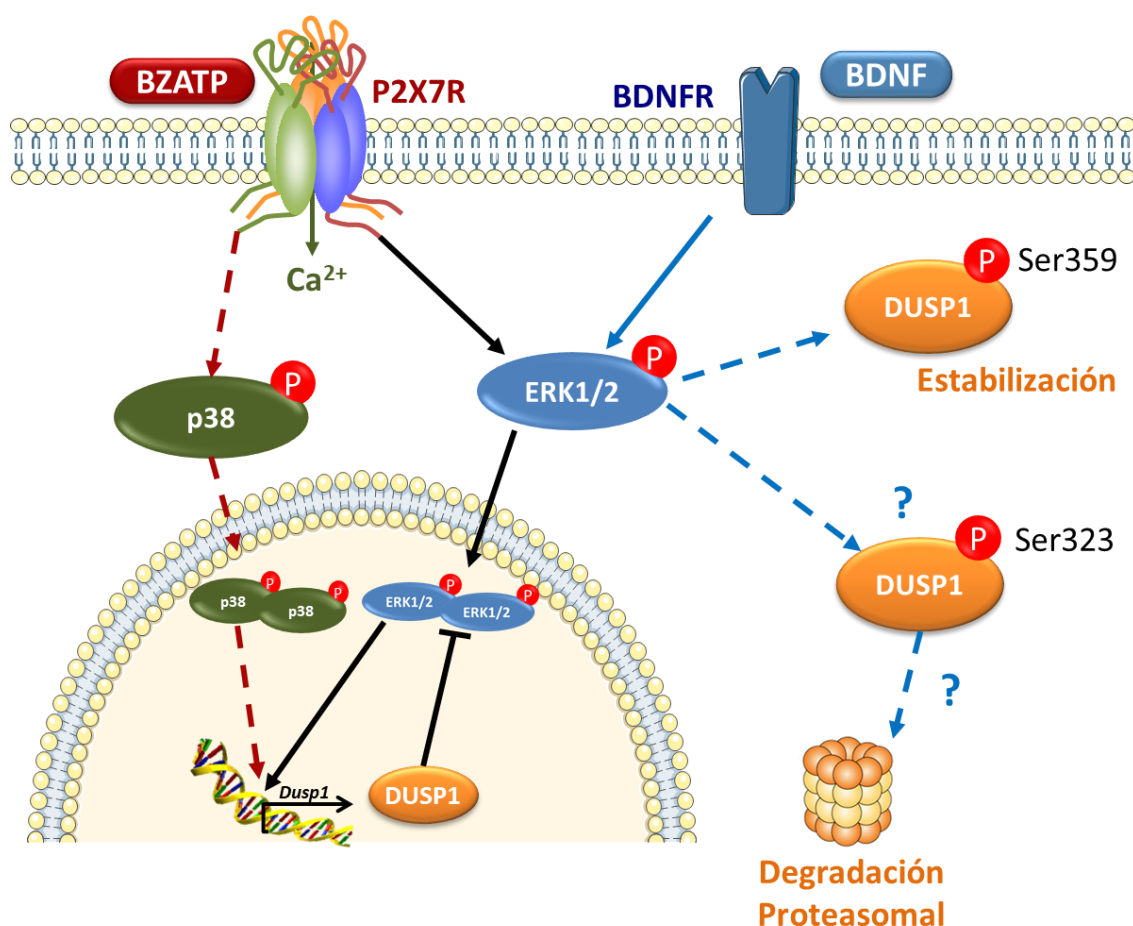
Es importante resaltar que los patrones de fosforilación de los residuos Ser323 y Ser359 se producen de manera inversa. La fosforilación en el residuo 323 coincide con un mayor nivel de activación de ERK mediado por BDNF. Mientras que la activación de ERK mantenida en el tiempo, aunque sea de menor intensidad, parece ser la responsable de la fosforilación del residuo 359. Esto indica que dependiendo de cómo se produzca la activación de ERK puede dar lugar a la fosforilación predominante o preferente en unos residuos u otros y el balance entre ambos, definirán la estabilización o desestabilización de DUSP1 y sus niveles de expresión finales. El mantenimiento de unos mayores niveles de DUSP1 contribuirá a una mayor desfosforilación de ERK en el núcleo y de la activación de sus dianas nucleares.

Por otra parte, es interesante remarcar que la regulación de DUSP1 está muy asociada a la neurotrofina BDNF, puesto que en las neuronas granulares se ha reproducido el mismo patrón de regulación que el descrito previamente en neuronas corticales murinas. Además de la inducción transcripcional de *Dusp1*, mediante el empleo de mutantes para los distintos residuos de serina de DUSP1 susceptibles de fosforilación por ERK, se



comprobó que la estabilización de DUSP1 por BDNF se producía a nivel de la fosforilación en Ser359 en cultivos primarios de neuronas corticales (Jeanneteau *et al.*, 2010). Sin embargo, una diferencia importante era que el efecto de BDNF en neuronas corticales también estaba mediado por  $K^+$ , de acuerdo con que la inducción de *Dusp1* era dependiente de la actividad sináptica. Las neuronas granulares se cultivan en condiciones de alta concentración de KCl, 25 mM, para mantener su supervivencia, ya que el solo hecho de retirar el potasio del medio induce la apoptosis (D'Mello *et al.*, 1997; Hetman *et al.*, 1999). En estas células, el potasio presente en el medio podría contribuir a un cierto nivel de activación basal de DUSP1, y apantallar el efecto de otros mediadores sobre DUSP1. Sin embargo, cuando se han ensayado estimulaciones despolarizantes de  $K^+$  de 60 mM no se han obtenido incrementos mayores sobre los niveles de proteína DUSP1 (datos no mostrados), mientras que con otras proteínas de señalización, como GSK3, sí se veían incrementos en su fosforilación debidos al propio  $K^+$  (Ortega *et al.*, 2009). Por tanto, aunque no se puede descartar su contribución, el BDNF parece tener un efecto por sí mismo sobre la expresión de DUSP1 por encima del posible efecto atribuido al  $K^+$ .

En conjunto, estos datos indican que la proteína DUSP1 se encuentra estrechamente regulada y está sometida a un control postraducciona l que opera a múltiples niveles en las neuronas granulares de cerebelo, si bien los mecanismos reguladores específicos pueden variar en función de los estímulos concretos que los pongan en marcha. En efecto, las fosforilaciones de DUSP1 en los residuos Ser323 y Ser359 no se han detectado en el caso de las estimulaciones con BzATP, explicándose de este modo los distintos patrones de expresión de DUSP1 obtenidos con ambos agonistas, P2X7 y BDNF. Por tanto, se puede concluir que el incremento de los niveles de DUSP1 a través de la señalización del receptor P2X7 dependería exclusivamente de su inducción transcripcional, mientras que en el caso del receptor TrkB jugarían un papel esencial, no sólo la inducción transcripcional, sino también la estabilización / desestabilización de la proteína mediante procesos de fosforilación (Figura 49).



**Figura 49. Representación esquemática de la regulación de DUSP1 por los receptores P2X7 y TrkB en neuronas granulares.** Los receptores P2X7 y de BDNF regulan la expresión de DUSP1 a través de la activación de ERK, induciendo su transcripción. Además, el receptor P2X7 también es capaz de inducir su activación transcripcional de manera dependiente de la quinasa de estrés p38. Por su parte, el receptor de BDNF también regula la estabilidad de la proteína DUSP1 siendo fosforilada por ERK1,2 y promoviendo su degradación a tiempos cortos y favoreciendo su estabilización a tiempos largos, describiendo un patrón bifásico similar al observado para DUSP6.

En conjunto, los resultados obtenidos de los estudios de regulación de las fosfatasa DUSP en neuronas granulares nos indican que los distintos mediadores extracelulares, nucleótidos y factores tróficos, funcionan regulando de la misma manera DUSP6, mientras que se encuentran grandes diferencias en el patrón de regulación de DUSP1. Asimismo, revelan que DUSP1 puede estar sometida a mecanismos de regulación diferentes por los distintos estímulos extracelulares, lo que puede mostrar una mayor sensibilidad a las diferencias en la cinética de activación de las ERK, o puede depender de los microdominios de señalización en los que se encuentre. En efecto, la señalización de ERK mediada por otros factores tróficos, como EGF e IGF-I, no parece ser lo suficientemente efectiva como para inducir ningún cambio en la expresión de DUSP1.



#### 4. Implicaciones fisiológicas de las proteínas fosfatasa DUSP6 y DUSP1 en las neuronas granulares de cerebelo.

Los trabajos realizados en neuronas granulares confirman que varios de los mecanismos de regulación descritos para las fosfatasa DUSP6 y DUSP1 se han podido reproducir en este modelo neural, sin el requerimiento de su sobreexpresión, y estableciendo distintos mediadores extracelulares como factores clave de su regulación, como son los nucleótidos, los factores de crecimiento y las neurotrofinas. DUSP1 parece ser más sensible a los cambios en el perfil de activación de ERK1,2, y podría presentar como sustrato a ERK1,2 a nivel nuclear. Mientras que estos mismos mediadores extracelulares también regularían los niveles de ERK1,2 citosólica a través de la fosfatasa DUSP6. La inducción de las proteínas fosfatasa DUSP6 y DUSP1 podría resultar beneficiosa para asegurar la fosforilación de las MAP quinasas dentro de unos niveles basales que son adecuados para el mantenimiento y la supervivencia neuronal.

##### 4.1. Papel en la diferenciación y maduración de las neuronas granulares.

Las variaciones de la expresión de DUSP1 y DUSP6 a lo largo de la maduración del cultivo de las neuronas granulares indicaban que podrían estar relacionadas con procesos de diferenciación y actuar de distinta manera, puesto que sus picos de expresión parecían tener una ventana temporal distinta y muy definida. DUSP6 se ha relacionado con el control de la señalización del receptor de FGF durante el desarrollo del cerebelo en el estadio embrionario del pez cebra (Liao *et al.*, 2013), aunque no se conoce mucho más sobre DUSP6 en el desarrollo del sistema nervioso. Sin embargo, el papel de BDNF, del receptor P2X7 y de DUSP1, han sido ampliamente estudiados a nivel de sistema nervioso y del crecimiento y diferenciación neuronal.

Nos basamos en estudios anteriores, en los que se había descrito cómo el receptor P2X7 regulaba de manera negativa la ramificación axonal y el crecimiento de neuritas, ya que la presencia de antagonistas del receptor P2X7, así como el silenciamiento de su expresión, parecía promover la diferenciación neuronal (Díaz-Hernández *et al.*, 2008; Gómez-Villafuertes *et al.*, 2009).

Por otro lado, nuestro grupo ya había estudiado previamente los efectos antiapoptóticos de los receptores P2X7 y de BDNF (Ortega *et al.*, 2010) y múltiples trabajos relacionados con su función en las neuronas granulares habían relacionado al BDNF con un papel crucial en el crecimiento y diferenciación neuronal (Contestabile, 2002). Las neurotrofinas son potentes reguladores del crecimiento y arborización dendrítica y axonal tanto en sistema nervioso periférico como central (McAllister, 2001). De hecho, en el cerebelo en desarrollo, se requiere el BDNF para el correcto desarrollo de las dendritas en las neuronas de Purkinje, no desarrollándose correctamente su arborización en ratones *knockout* para la expresión de la neurotrofina BDNF (Lom y Cohen-Cory, 1999; Segal *et al.*, 1995). Además de esta función, resultan esenciales para el mantenimiento de una adecuada señalización de las cascadas de las MAPKs, regulando, a su vez, a las proteínas fosfatasa. En concreto, este balance entre los mecanismos de activación y desactivación de las MAPKs es necesario para el refinamiento de los procesos de diferenciación y proliferación de las distintas poblaciones neuronales, asegurando que se produzcan los niveles adecuados de crecimiento axonal y arborización dendrítica.

El trabajo previo del equipo de F. Jeanneteau (2010) nos sirvió como punto de partida para nuestro estudio. En él se demostró el importante papel de la neurotrofina BDNF en la diferenciación de cultivos primarios de neuronas corticales murinas, ejercido a través

de la regulación de la proteína fosfatasa DUSP1. En primer lugar, se vio la implicación de BDNF en la inducción transcripcional y en la estabilización de la fosfatasa DUSP1, de manera dependiente de ERK, identificando las JNK como el sustrato preferente. La desfosforilación de ciertos sustratos específicos de JNK que regulan las dinámicas del citoesqueleto se correlaciona con el crecimiento de la arborización dendrítica y ramificación axonal promovidas por BDNF (Jeanneteau *et al.*, 2010; Jeanneteau y Deinhardt, 2011). Este efecto de la DUSP1 se corroboró en estudios *in vivo* realizados en corteza de ratón en los que se constató que, tanto la sobreexpresión de DUSP1 como su delección genética, son las responsables de una morfología aberrante en distintas poblaciones de neuronas corticales murinas. En base a estos estudios se decidió realizar una estancia predoctoral en el laboratorio del grupo del Dr. Freddy Jeanneteau, a fin de estudiar cómo podría estar afectando esta fosfatasa al crecimiento y diferenciación de las neuronas granulares de cerebelo de ratón en cultivo, cuando fuera regulada tanto por el receptor P2X7 como por el TrkB, ya que, a diferencia de las neuronas corticales, las neuronas granulares de cerebelo expresan constitutivamente DUSP1.

El uso de herramientas de Biología Molecular para llevar a cabo el silenciamiento de la fosfatasa de especificidad dual DUSP1 nos proveyó de una importante aproximación metodológica para el estudio del papel de esta fosfatasa en el desarrollo del cultivo.

Pudimos comprobar que a 4 DIV BzATP y BDNF no ejercían ningún efecto significativo a nivel de la longitud de los axones y que parecían disminuir ligeramente la longitud de las dendritas en las condiciones control. Sin embargo, el silenciamiento de DUSP1 producía un potente incremento en la longitud axónica de manera basal, y que el tratamiento de las neuronas granulares de cerebelo de ratón durante toda una noche con BzATP o BDNF incrementaba dicho efecto tanto a nivel axónico como dendrítico. En cambio, la estimulación con los agonistas parecía disminuir la ramificación axónica en condiciones control, viéndose revertido dicho efecto con el silenciamiento de DUSP1, el cual, por sí mismo, daba lugar a la aparición de la arborización dendrítica. De este modo parece que el silenciamiento de DUSP1 promueve un mayor crecimiento y la maduración neuronal en etapas tempranas del cultivo. Y por tanto en estas etapas DUSP1 estaría ejerciendo un freno frente al efecto de ERK1,2 en la diferenciación celular, evitando una longitud axonal y dendrítica excesiva que pudiera dar lugar a contactos sinápticos aberrantes, y una ramificación dendrítica demasiado aumentada. Esto se produciría en condiciones de ausencia de DUSP1 cuando la señalización de ERK estuviera muy activada.

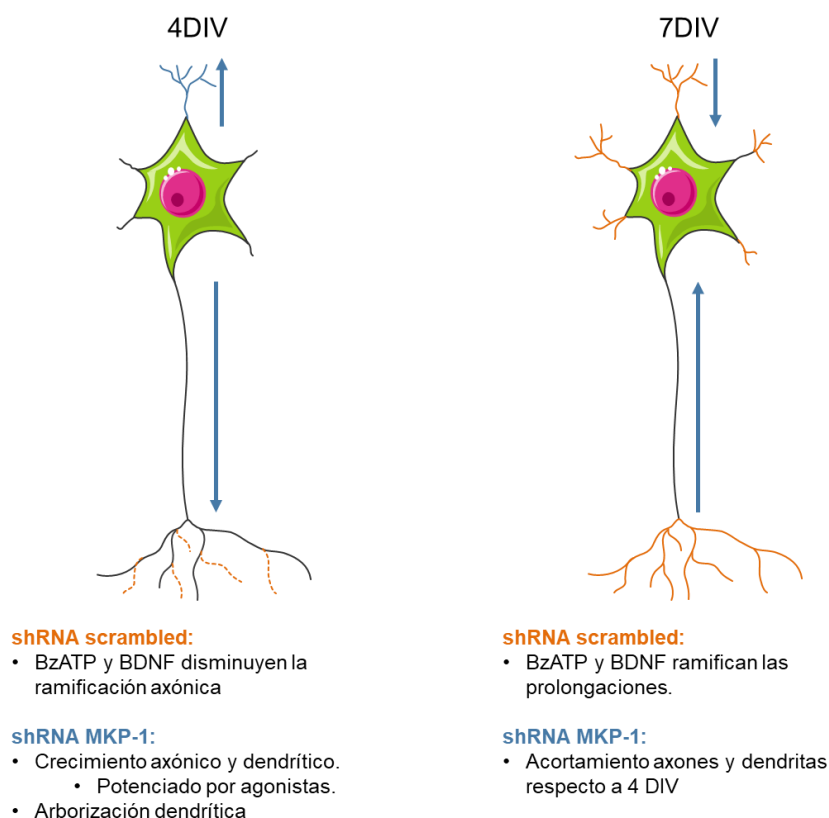
Además, la falta de efecto claro de los agonistas BzATP y BDNF se podría explicar en base a los resultados obtenidos en cultivos de neuronas granulares de rata, que podrían ser extrapolables a los de ratón. Porque a estos estadios, a 4 DIV, la expresión del receptor P2X7 aún es baja y la de DUSP1 alta, siendo aún necesario el análisis de la expresión del receptor de BDNF. De acuerdo con esto, a 4 DIV los agonistas podrían no estar surtiendo efecto en condiciones control ya que los niveles de DUSP1 a 4 DIV ya son lo suficientemente elevados como para incrementar el efecto por encima del basal. En cambio, su silenciamiento podría dejar vía libre a la activación de la señalización de ERK1,2, promoviendo los efectos de la diferenciación celular por parte de los agonistas a estadios más tempranos.

A los 7 DIV, cuando el cultivo se encuentra más diferenciado, no parece observarse ningún efecto llamativo ni de los tratamientos con BzATP y BDNF, ni del silenciamiento de DUSP1, en cuanto a la longitud axónica y dendrítica se refiere. No obstante, el silenciamiento de DUSP1 sí parece disminuir la longitud dendrítica, que se recupera en

los tratamientos con el agonista nucleotídico BzATP y con BDNF. Es importante destacar en este caso, el efecto del silenciamiento de DUSP1, ya que parece reducir la longitud axónica y dendrítica respecto a lo observado a 4 DIV. Sin embargo, en esta etapa del cultivo podemos observar que tanto el BzATP como el BDNF promueven las ramificaciones axonales y dendríticas y que el silenciamiento de DUSP1 frena dicho efecto, dando un aspecto de neuronas más cortas pero más ramificadas. Posiblemente esto podría deberse a un cambio en la dinámica del citoesqueleto, que bloquee el crecimiento en longitud en pos de un mayor crecimiento a nivel de ramificaciones (Figura 50). Es decir, que en estadios más diferenciados, DUSP1 sería dispensable, y concuerda con su bajada de expresión paulatina desde 2 DIV hasta 7-10 DIV. En cambio los niveles de los receptores P2X7, y probablemente del receptor de BDNF, son más altos a 7DIV, y ello permite que la nueva inducción transcripcional de *Dusp1* por parte de estos estímulos extracelulares pudiera promover la arborización axonal y dendrítica.

Parece, por tanto, que nos encontramos ante una distinta regulación de la actividad de DUSP1 a lo largo de la maduración del cultivo. A 4 DIV parece ser importante para promover el crecimiento axonal y dendrítico en longitud, mientras que a 7 DIV parece jugar un papel crucial en la ramificación axonal y en la arborización dendrítica. Esto podría deberse a una distinta localización subcelular a lo largo del cultivo o a un cambio de sustrato a lo largo de la maduración. En nuestro caso, y a diferencia de lo descrito previamente en las neuronas corticales, JNK no parece ser un sustrato de DUSP1, ya que nunca hemos observado cambios en la fosforilación de estas proteínas quinasas en los tratamientos con nuestros agonistas (datos no mostrados), por lo que se sugiere que el balance p38/ERK1,2 a lo largo del cultivo podría ser el motivo de este distinto efecto.

Por otra parte, el retraimiento de las prolongaciones neuronales a 7 DIV con el silenciamiento de DUSP1 podría ser debido a una desestabilización del citoesqueleto en los conos de crecimiento. El hecho de que la longitud axónica sea la misma en las células control que en las silenciadas a 7 DIV sustenta la hipótesis de la importancia de DUSP1 como modulador del crecimiento axónico y dendrítico en etapas iniciales del cultivo, siendo menos importante este proceso en etapas más avanzadas y, por tanto, disminuyendo sus niveles y su actividad, frenando el crecimiento en longitud de las células. Sin embargo, el incremento de sus niveles inducido por los tratamientos a 7 DIV estaría promoviendo la ramificación axónica y dendrítica, esta última solamente en el caso del BzATP. Esto podría deberse a que las MAPK ya estarían menos activadas para evitar que las células sigan creciendo en esta fase del cultivo y, por tanto, un aumento de su desfosforilación por la inducción de DUSP1 en esta fase podría estar fomentando la formación de nuevas ramificaciones. El hecho de que la estimulación del receptor P2X7 pero no el de BDNF promueva la arborización dendrítica podría estar dando cuenta de la distinta regulación de la fosfatasa en nuestro modelo neuronal, siendo necesaria tan sólo una activación transitoria y no sostenida para promover la arborización dendrítica. Se necesitan realizar más estudios para identificar cuál es la quinasa implicada en todos estos procesos y su localización subcelular, así como otras posibles proteínas sustrato de la quinasa o de la fosfatasa que medien estos efectos. Todos estos efectos se esquematizan en la Figura 50.



**Figura 50. Esquema resumen de los efectos de los tratamientos con BzATP y BDNF y del silenciamiento de DUSP1 en las neuronas granulares de cerebelo de ratón a 4 y a 7 DIV.**

Los resultados obtenidos en neuronas granulares confirman el papel de DUSP1 en la regulación de la diferenciación neuronal, que podría tener distintas consecuencias en función del modelo celular y la especificidad de sustrato que muestre en él. De manera diferente a las neuronas granulares, en el caso de las neuronas corticales, el silenciamiento de DUSP1 daba lugar a una pérdida de la arborización dendrítica, mientras que la sobreexpresión promovía una arborización axónica aberrante. Como se ha comentado anteriormente, DUSP1 parecía ejercer su efecto a través de la inactivación de JNK, evitando así la activación de estatmina y bloqueando el crecimiento axónico (Jeanneteau *et al.*, 2010). Sin embargo, en neuronas dopaminérgicas es la inhibición de p38 y no la de JNK por parte de DUSP1, la que incrementa las ramificaciones de las neuritas y el crecimiento en longitud (Collins *et al.*, 2013). Todos estos datos en su conjunto indican que DUSP1 es un prometedor mediador del crecimiento y ramificación de los procesos neuronales, pero se necesita realizar más trabajo para determinar su potencial efecto beneficioso frente a enfermedades neurodegenerativas u otras patologías que cursen con un crecimiento y/o maduración neuronal aberrante.

#### 4.2. Otras implicaciones fisiológicas de las DUSPs en el sistema nervioso.

Además de las funciones de las fosfatasa DUSP regulando la diferenciación neuronal, la adecuada regulación del balance entre activación/desactivación de las MAP quinasas resulta clave en las poblaciones neurales para asegurar su supervivencia.

Las evidencias de muchos estudios apuntan a que la recuperación de los niveles basales de las proteínas fosfatasa es necesaria para mantener la supervivencia y prevenir la muerte frente a la llegada de determinados estímulos apoptóticos y condiciones de estrés. En estas condiciones la sobreactivación de las MAP quinasas va en paralelo a la desregulación y falta de función de las proteínas fosfatasa DUSPs, bien por la pérdida de su expresión o por su inactivación, como tiene lugar en condiciones excitotóxicas, y por la exposición a estrés oxidativo y genotóxico (Luo y DeFranco, 2006; Levinthal y DeFranco, 2005; Choi *et al.*, 2006; Gozdz *et al.*, 2003; Gozdz *et al.*, 2008; Hetman *et al.*, 1999; Morente *et al.*, 2014). La restauración de los niveles de DUSPs evita las consecuencias apoptóticas de la sobreactivación de las MAP quinasas, sobre todo de las quinasas de estrés, p38 y JNK (Chu *et al.*, 2004; Ramos, 2008; Eljaschewitsch *et al.*, 2006; Morente *et al.*, 2014).

El posible papel neuroprotector de las proteínas fosfatasa se manifiesta también en procesos neurodegenerativos o de daño cerebral, en los que se han descrito cambios drásticos en la actividad y expresión de las fosfatasa DUSP (Jeanneteau y Chao, 2013; Banzhaf-Strathmann *et al.*, 2014; Collins *et al.*, 2015). La señalización aberrante de las MAP quinasas en estos procesos es responsable de muchos de los eventos tóxicos que caracterizan estos procesos neurodegenerativos, como la apoptosis, los agregados proteicos y los cambios en las dinámicas del citoesqueleto (Colucci-D'Amato *et al.*, 2003; Bhore *et al.*, 2017; Johnson y Bailey, 2003). No obstante, en procesos neurológicos y trastornos psiquiátricos es, por el contrario, la ganancia de función de proteínas DUSP, la que resulta tóxica. En este contexto, conviene resaltar que la sobreexpresión de DUSPs como estrategia terapéutica podría tener consecuencias no deseadas si previene las acciones prosupervivencia de la señalización dependiente de ERK. Por tanto, es necesario encontrar un balance adecuado entre la señales de supervivencia y diferenciación para asegurar que se mantenga la homeostasis de las MAP quinasas y así asegurar el correcto mantenimiento de las poblaciones neurales.



## ***CONCLUSIONES***





1- Los niveles de expresión de las fosfatasa de especificidad dual DUSP1 y DUSP6 varían a lo largo del cultivo de las neuronas granulares de cerebelo de manera inversa. La expresión de DUSP1 es mayor en estadios más tempranos, indicando que puede ser clave en la diferenciación. Mientras que DUSP6 va incrementando sus niveles de manera paralela a lo que ocurre con el receptor P2X7.

2- Los receptores P2X7 regulan los niveles de la proteína fosfatasa específica de ERK, DUSP6 con un patrón bifásico. Estimulaciones inferiores a 30 minutos disminuyen los niveles de la fosfatasa mediante su degradación vía proteasoma, mientras que estimulaciones prolongadas, hasta 6 horas, permiten recuperar los niveles basales a través de la inducción transcripcional. Ambos procesos dependientes de la activación de las proteínas ERK 1,2. Esta regulación bifásica representa un mecanismo de retroalimentación negativa para asegurar los niveles de activación de estas MAP quinasas.

3- Los receptores P2X7 y TrkB modulan los niveles de la fosfatasa nuclear DUSP1 en neuronas granulares describiendo un patrón distinto. La activación del receptor P2X7 induce una expresión transitoria de DUSP1 dependiente de ERK1,2. Mientras que la estimulación con BDNF promueve un patrón de expresión mantenido en el tiempo que se debe a la contribución de dos mecanismos, la inducción transcripcional de *Dusp1* y la estabilización de la proteína, ambos procesos dependientes de la señalización de ERK1,2.

4- La regulación de DUSP1 y DUSP6 por receptores P2X7 y Trks se ha validado en neuronas granulares de cerebelo de ratón. DUSP1 desempeña un importante papel en el desarrollo neuronal, ejerciendo distintos efectos en función de la etapa de maduración neuronal. El silenciamiento de DUSP1 favorece la ramificación axónica y la arborización dendrítica promovida por los receptores P2X7 y TrkB a 4 días de cultivo, mientras que a 7 días de cultivo el silenciamiento de DUSP1 bloquea dichos efectos.



## ***CONCLUSIONS***



- 1- The expression levels of dual specificity phosphatases, DUSP1 and DUSP6, vary along the course of the cerebellar granule neuron culture. DUSP1 expression is higher in immature stages of the culture, indicating a key role during differentiation of cerebellar granule neurons. While DUSP6 expression levels increase and run in parallel to P2X7 receptor.
- 2- P2X7 receptors regulate the expression levels of the ERK-directed phosphatase, DUSP6 protein, in a biphasic way. Short-term stimulations of 30 min decrease DUSP6 protein levels via proteasomal degradation. This is followed by DUSP6 basal levels recovery after prolonged stimulations of 2 – 6 hours due to *Dusp6* transcriptional induction. Both processes are dependent on ERK signalling. Therefore, DUSP6 biphasic regulation represents a feedback regulatory mechanism to fine tune MAPK activation.
- 3- P2X7 and neurotrophin receptors, TrkB, differently regulate nuclear and inducible protein phosphatase DUSP1 in granule neurons. P2X7 receptor activation induces the ERK-dependent transient increase of DUSP1 protein levels. On the other hand, the BDNF stimulation promotes a more sustained expression pattern of DUSP1 protein. This can be explained by the concurrence of two mechanisms: *Dusp1* gene transcriptional induction and DUSP1 protein stabilization through phosphorylation, both processes being dependent on ERK1,2 signalling.
- 4- The regulation of the phosphatases DUSP1 and DUSP6 through P2X7 and Trk receptors has been validated in mouse cerebellar granule neurons. DUSP1 seems to play a crucial regulatory role in neuronal development, and its effect depends on the stage of neuronal differentiation. At 4 days *in vitro*, DUSP1 silencing favours axonal and dendritic branching of granule neurons promoted by P2X7 and Trk receptors, but at 7 days *in vitro*, these potentiation effect is lost after DUSP1 silencing.





## ***BIBLIOGRAFÍA***



- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews* 58 (3):281-341. doi:10.1124/pr.58.3.3
- Adinolfi E, Cirillo M, Woltersdorf R, Falzoni S, Chiozzi P, Pellegatti P, Callegari MG, Sandona D, Markwardt F, Schmalzing G, Di Virgilio F (2010) Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (9):3393-3404. doi:10.1096/fj.09-153601
- Al-Mutairi M, Al-Harathi S, Cadalbert L, Plevin R (2010) Over-expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-2 enhances adhesion molecule expression and protects against apoptosis in human endothelial cells. *British journal of pharmacology* 161 (4):782-798. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00952.x
- Algaier I, Jakubowski JA, Asai F, von Kugelgen I (2008) Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y12 receptor. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 6 (11):1908-1914. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03136.x
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117 (6):699-711. doi:10.1016/j.cell.2004.05.018
- Alloisio S, Di Garbo A, Barbieri R, Bozzo L, Ferroni S, Nobile M (2010) Evidence for two conductive pathways in P2X receptor: differences in modulation and selectivity. *Journal of neurochemistry* 113 (3):796-806. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06649.x
- Amadio S, D'Ambrosi N, Cavaliere F, Murra B, Sancesario G, Bernardi G, Burnstock G, Volonte C (2002) P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. *Neuropharmacology* 42 (4):489-501
- Amadio S, Vacca F, Martorana A, Sancesario G, Volonte C (2007) P2Y1 receptor switches to neurons from glia in juvenile versus neonatal rat cerebellar cortex. *BMC developmental biology* 7:77. doi:10.1186/1471-213X-7-77
- Amoroso F, Capece M, Rotondo A, Cangelosi D, Ferracin M, Franceschini A, Raffaghello L, Pistoia V, Varesio L, Adinolfi E (2015) The P2X7 receptor is a key modulator of the PI3K/GSK3beta/VEGF signaling network: evidence in experimental neuroblastoma. *Oncogene* 34 (41):5240-5251. doi:10.1038/onc.2014.444
- Aoki N, Aoyama K, Nagata M, Matsuda T (2001) A growing family of dual specificity phosphatases with low molecular masses. *Journal of biochemistry* 130 (1):133-140. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002952
- Apps R, Garwicz M (2000) Precise matching of olivo-cortical divergence and cortico-nuclear convergence between somatotopically corresponding areas in the medial C1 and medial C3 zones of the paravermal cerebellum. *The European journal of neuroscience* 12 (1):205-214
- Arango-Lievano M, Peguet C, Catteau M, Parmentier ML, Wu S, Chao MV, Ginsberg SD, Jeanneteau F (2016) Deletion of Neurotrophin Signaling through the Glucocorticoid Receptor Pathway Causes Tau Neuropathology. *Scientific reports* 6:37231. doi:10.1038/srep37231
- Arbeloa J, Perez-Samartin A, Gottlieb M, Matute C (2012) P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiology of disease* 45 (3):954-961. doi:10.1016/j.nbd.2011.12.014
- Arthur JS (2008) MSK activation and physiological roles. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:5866-5879
- Athias M (1897) Recherches sur l'histogénèse de l'écorce du cervelet. *J Anat Physiol* 33:372-404

- Bae YK, Kani S, Shimizu T, Tanabe K, Nojima H, Kimura Y, Higashijima S, Hibi M (2009) Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Developmental biology* 330 (2):406-426. doi:10.1016/j.ydbio.2009.04.013
- Bagrodia S, Derijard B, Davis RJ, Cerione RA (1995) Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *The Journal of biological chemistry* 270 (47):27995-27998. doi:10.1074/jbc.270.47.27995
- Balazs R, Gallo V, Kingsbury A (1988) Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Brain research* 468 (2):269-276. doi:10.1016/0165-3806(88)90139-3
- Bang YJ, Kwon JH, Kang SH, Kim JW, Yang YC (1998) Increased MAPK activity and MKP-1 overexpression in human gastric adenocarcinoma. *Biochemical and biophysical research communications* 250 (1):43-47. doi:10.1006/bbrc.1998.9256
- Banzhaf-Strathmann J, Benito E, May S, Arzberger T, Tahirovic S, Kretschmar H, Fischer A, Edbauer D (2014) MicroRNA-125b induces tau hyperphosphorylation and cognitive deficits in Alzheimer's disease. *The EMBO journal* 33 (15):1667-1680. doi:10.15252/embj.201387576
- Bartlett R, Stokes L, Sluyter R (2014) The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. *Pharmacological reviews* 66 (3):638-675. doi:10.1124/pr.113.008003
- Becker EB, Stoodley CJ (2013) Autism spectrum disorder and the cerebellum. *International review of neurobiology* 113:1-34. doi:10.1016/B978-0-12-418700-9.00001-0
- Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ (1998) Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Current biology : CB* 8 (19):1049-1057
- Berk M, Plein H, Ferreira D, Jersky B (2001) Blunted adenosine A2a receptor function in platelets in patients with major depression. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 11 (2):183-186
- Bermudez O, Marchetti S, Pages G, Gimond C (2008) Post-translational regulation of the ERK phosphatase DUSP6/MKP3 by the mTOR pathway. *Oncogene* 27 (26):3685-3691. doi:10.1038/sj.onc.1211040
- Bessette DC, Qiu D, Pallen CJ (2008) PRL PTPs: mediators and markers of cancer progression. *Cancer metastasis reviews* 27 (2):231-252. doi:10.1007/s10555-008-9121-3
- Bhore N, Wang BJ, Chen YW, Liao YF (2017) Critical Roles of Dual-Specificity Phosphatases in Neuronal Proteostasis and Neurological Diseases. *International journal of molecular sciences* 18 (9). doi:10.3390/ijms18091963
- Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, Park HS, Yu H, Metzger R, Kowaluk E, Jarvis MF, van Biesen T (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *European journal of pharmacology* 376 (1-2):127-138. doi:10.1016/s0014-2999(99)00350-7
- Bode AM, Dong Z (2007) The functional contrariety of JNK. *Molecular carcinogenesis* 46 (8):591-598. doi:10.1002/mc.20348
- Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC (2010) c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochimica et biophysica acta* 1804 (3):463-475. doi:10.1016/j.bbapap.2009.11.002
- Bohn JA, Van Etten JL, Schagat TL, Bowman BM, McEachin RC, Freddolino PL, Goldstrohm AC (2018) Identification of diverse target RNAs that are functionally regulated by human Pumilio proteins. *Nucleic acids research* 46 (1):362-386. doi:10.1093/nar/gkx1120

- Bonan GdPCaCD (2010) Ectonucleotidases and Epilepsy The Open Neuroscience Journal 4:44-52
- Bordo D, Bork P (2002) The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. EMBO reports 3 (8):741-746. doi:10.1093/embo-reports/kvf150
- Borea PA, Gessi S, Merighi S, Varani K (2016) Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its Protective Effects? Trends in pharmacological sciences 37 (6):419-434. doi:10.1016/j.tips.2016.02.006
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72:248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Bradley JR, Pober JS (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Oncogene 20 (44):6482-6491. doi:10.1038/sj.onc.1204788
- Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. Nature 371 (6497):519-523. doi:10.1038/371519a0
- Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J, McKenzie FR (1997) The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. The Journal of biological chemistry 272 (2):1368-1376. doi:10.1074/jbc.272.2.1368
- Brondello JM, Pouyssegur J, McKenzie FR (1999) Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. Science 286 (5449):2514-2517. doi:10.1126/science.286.5449.2514
- Broussard DM, Titley HK, Antflick J, Hampson DR (2011) Motor learning in the VOR: the cerebellar component. Experimental brain research 210 (3-4):451-463. doi:10.1007/s00221-011-2589-z
- Browne LE, Compan V, Bragg L, North RA (2013) P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 33 (8):3557-3566. doi:10.1523/JNEUROSCI.2235-12.2013
- Buckner RL (2013) The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. Neuron 80 (3):807-815. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.044
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. Pharmacological reviews 24 (3):509-581
- Burnstock G (2006a) Historical review: ATP as a neurotransmitter. Trends in pharmacological sciences 27 (3):166-176. doi:10.1016/j.tips.2006.01.005
- Burnstock G (2006b) Purinergic signalling--an overview. Novartis Foundation symposium 276:26-48; discussion 48-57, 275-281
- Burnstock G (2013) Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential. The Keio journal of medicine 62 (3):63-73
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. British journal of pharmacology 40 (4):668-688. doi:10.1111/j.1476-5381.1970.tb10646.x
- Burnstock G, Kennedy C (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? General pharmacology 16 (5):433-440
- Butler AB, & Hodos, W. (1996) Comparative vertebrate neuroanatomy: Evolution and adaptation. Wiley-Liss, New York, NY, US
- Buxade M, Parra-Palau JL, Proud CG (2008) The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases). Frontiers in bioscience : a journal and virtual library 13:5359-5373
- Cagnol S, Rivard N (2013) Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4

- (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene* 32 (5):564-576. doi:10.1038/onc.2012.88
- Camps M, Chabert C, Muda M, Boschert U, Gillieron C, Arkinstall S (1998) Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC12. *FEBS letters* 425 (2):271-276. doi:10.1016/s0014-5793(98)00250-6
- Camps M, Nichols A, Arkinstall S (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (1):6-16
- Cao W, Bao C, Padalko E, Lowenstein CJ (2008) Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling. *The Journal of experimental medicine* 205 (6):1491-1503. doi:10.1084/jem.20071728
- Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 75 (1):50-83. doi:10.1128/MMBR.00031-10
- Cargnello M, Tcherkezian J, Dorn JF, Huttlin EL, Maddox PS, Gygi SP, Roux PP (2012) Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-transporter (4E-T) by c-Jun N-terminal kinase promotes stress-dependent P-body assembly. *Molecular and cellular biology* 32 (22):4572-4584. doi:10.1128/MCB.00544-12
- Carmo MR, Menezes AP, Nunes AC, Pliassova A, Rolo AP, Palmeira CM, Cunha RA, Canas PM, Andrade GM (2014) The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of Parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis. *Neuropharmacology* 81:142-152. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.01.045
- Carrasquero LM, Delicado EG, Bustillo D, Gutierrez-Martin Y, Artalejo AR, Miras-Portugal MT (2009) P2X7 and P2Y13 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes. *Journal of neurochemistry* 110 (3):879-889. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06179.x
- Carriere A, Cargnello M, Julien LA, Gao H, Bonneil E, Thibault P, Roux PP (2008) Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Current biology : CB* 18 (17):1269-1277. doi:10.1016/j.cub.2008.07.078
- Caunt CJ, Keyse SM (2013) Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *The FEBS journal* 280 (2):489-504. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08716.x
- Cejudo-Marin R, Tarrega C, Nunes-Xavier CE, Pulido R (2012) Caspase-3 cleavage of DUSP6/MKP3 at the interdomain region generates active MKP3 fragments that regulate ERK1/2 subcellular localization and function. *Journal of molecular biology* 420 (1-2):128-138. doi:10.1016/j.jmb.2012.04.004
- Cerminara NL, Lang EJ, Sillitoe RV, Apps R (2015) Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nature reviews Neuroscience* 16 (2):79-93. doi:10.1038/nrn3886
- Ceulemans H, Bollen M (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiological reviews* 84 (1):1-39. doi:10.1152/physrev.00013.2003
- Cockcroft S, Gomperts BD (1979) Activation and inhibition of calcium-dependent histamine secretion by ATP ions applied to rat mast cells. *The Journal of physiology* 296:229-243. doi:10.1113/jphysiol.1979.sp013002
- Colucci-D'Amato L, Perrone-Capano C, di Porzio U (2003) Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 25 (11):1085-1095. doi:10.1002/bies.10355
- Collins LM, Downer EJ, Toulouse A, Nolan YM (2015) Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase (MKP)-1 in Nervous System Development and Disease. *Molecular neurobiology* 51 (3):1158-1167. doi:10.1007/s12035-014-8786-6



- Collins LM, O'Keeffe GW, Long-Smith CM, Wyatt SL, Sullivan AM, Toulouse A, Nolan YM (2013) Mitogen-activated protein kinase phosphatase (MKP)-1 as a neuroprotective agent: promotion of the morphological development of midbrain dopaminergic neurons. *Neuromolecular medicine* 15 (2):435-446. doi:10.1007/s12017-013-8230-5
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36 (9):1277-1283
- Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, Buell G (1996) Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16 (8):2495-2507
- Compan V, Ulmann L, Stelmashenko O, Chemin J, Chaumont S, Rassendren F (2012) P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (12):4284-4296. doi:10.1523/JNEUROSCI.6332-11.2012
- Contestabile A (2002) Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum* 1 (1):41-55. doi:10.1080/147342202753203087
- Corbit KC, Soh JW, Yoshida K, Eves EM, Weinstein IB, Rosner MR (2000) Different protein kinase C isoforms determine growth factor specificity in neuronal cells. *Molecular and cellular biology* 20 (15):5392-5403. doi:10.1128/mcb.20.15.5392-5403.2000
- Costenla AR, Lopes LV, de Mendonca A, Ribeiro JA (2001) A functional role for adenosine A3 receptors: modulation of synaptic plasticity in the rat hippocampus. *Neuroscience letters* 302 (1):53-57. doi:10.1016/s0304-3940(01)01633-0
- Csolle C, Sperlagh B (2010) Peripheral origin of IL-1 $\beta$  production in the rodent hippocampus under in vivo systemic bacterial lipopolysaccharide (LPS) challenge and its regulation by P2X(7) receptors. *Journal of neuroimmunology* 219 (1-2):38-46. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.11.011
- Cuadrado A (2015) Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/ $\beta$ -TrCP. *Free radical biology & medicine* 88 (Pt B):147-157. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.029
- Cuadrado A, Kugler S, Lastres-Becker I (2018) Pharmacological targeting of GSK-3 and NRF2 provides neuroprotection in a preclinical model of tauopathy. *Redox biology* 14:522-534. doi:10.1016/j.redox.2017.10.010
- Cuadrado A, Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical journal* 429 (3):403-417. doi:10.1042/BJ20100323
- Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1773 (8):1358-1375. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010
- Cui Y, Parra I, Zhang M, Hilsenbeck SG, Tsimelzon A, Furukawa T, Horii A, Zhang ZY, Nicholson RI, Fuqua SA (2006) Elevated expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 in breast tumors: a mechanism of tamoxifen resistance. *Cancer research* 66 (11):5950-5959. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3243
- Cunha RA (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry international* 38 (2):107-125
- Cunha RA, Ribeiro JA (2000) ATP as a presynaptic modulator. *Life sciences* 68 (2):119-137. doi:10.1016/s0024-3205(00)00923-1
- Chan DW, Liu VW, Tsao GS, Yao KM, Furukawa T, Chan KK, Ngan HY (2008) Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* 29 (9):1742-1750. doi:10.1093/carcin/bgn167
- Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, Belda-Iniesta C, Moratilla C, Cejas P, Fresno-Vara JA, de Castro-Carpeno J, Casado E, Nistal M, Gonzalez-



- Baron M, Perona R (2006) MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 25 (23):3335-3345. doi:10.1038/sj.onc.1209364
- Cheewatrakoolpong B, Gilchrest H, Anthes JC, Greenfeder S (2005) Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochemical and biophysical research communications* 332 (1):17-27. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.087
- Chessell IP, Simon J, Hibell AD, Michel AD, Barnard EA, Humphrey PP (1998) Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS letters* 439 (1-2):26-30. doi:10.1016/S0014-5793(98)01332-5
- Chi H, Barry SP, Roth RJ, Wu JJ, Jones EA, Bennett AM, Flavell RA (2006) Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (7):2274-2279. doi:10.1073/pnas.0510965103
- Chi H, Flavell RA (2008) Acetylation of MKP-1 and the control of inflammation. *Science signaling* 1 (41):pe44. doi:10.1126/scisignal.141pe44
- Chiarugi P, Cirri P (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends in biochemical sciences* 28 (9):509-514. doi:10.1016/S0968-0004(03)00174-9
- Choi BH, Hur EM, Lee JH, Jun DJ, Kim KT (2006) Protein kinase Cdelta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death. *Journal of cell science* 119 (Pt 7):1329-1340. doi:10.1242/jcs.02837
- Choi RC, Simon J, Tsim KW, Barnard EA (2008) Constitutive and agonist-induced dimerizations of the P2Y1 receptor: relationship to internalization and scaffolding. *The Journal of biological chemistry* 283 (16):11050-11063. doi:10.1074/jbc.M709266200
- Chow SC, Kass GE, Orrenius S (1997) Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacology* 36 (9):1149-1156
- Christie GR, Williams DJ, Macisaac F, Dickinson RJ, Rosewell I, Keyse SM (2005) The dual-specificity protein phosphatase DUSP9/MKP-4 is essential for placental function but is not required for normal embryonic development. *Molecular and cellular biology* 25 (18):8323-8333. doi:10.1128/MCB.25.18.8323-8333.2005
- Chu CT, Levinthal DJ, Kulich SM, Chalovich EM, DeFranco DB (2004) Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *European journal of biochemistry* 271 (11):2060-2066. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04132.x
- Chung CT, Miller RH (1988) A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic acids research* 16 (8):3580. doi:10.1093/nar/16.8.3580
- D'Alimonte I, Ballerini P, Nargi E, Buccella S, Giuliani P, Di Iorio P, Caciagli F, Ciccarelli R (2007) Staurosporine-induced apoptosis in astrocytes is prevented by A1 adenosine receptor activation. *Neuroscience letters* 418 (1):66-71. doi:10.1016/j.neulet.2007.02.061
- D'Ambrosi N, Iafrate M, Saba E, Rosa P, Volonte C (2007) Comparative analysis of P2Y4 and P2Y6 receptor architecture in native and transfected neuronal systems. *Biochimica et biophysica acta* 1768 (6):1592-1599. doi:10.1016/j.bbamem.2007.03.020
- D'Mello SR, Borodezt K, Soltoff SP (1997) Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (5):1548-1560
- da Silva JS, Dotti CG (2002) Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nature reviews Neuroscience* 3 (9):694-704. doi:10.1038/nrn918

- De Vuyst E, Decrock E, Cabooter L, Dubyak GR, Naus CC, Evans WH, Leybaert L (2006) Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *The EMBO journal* 25 (1):34-44. doi:10.1038/sj.emboj.7600908
- Denu JM, Dixon JE (1998) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Current opinion in chemical biology* 2 (5):633-641
- Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267 (5198):682-685. doi:10.1126/science.7839144
- Di Virgilio F, Sanz JM, Chiozzi P, Falzoni S (1999) The P2Z/P2X7 receptor of microglial cells: a novel immunomodulatory receptor. *Progress in brain research* 120:355-368
- Diaz-Hernandez JI, Gomez-Villafuertes R, Leon-Otegui M, Hontecillas-Prieto L, Del Puerto A, Trejo JL, Lucas JJ, Garrido JJ, Gualix J, Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M (2012) In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3beta and secretases. *Neurobiology of aging* 33 (8):1816-1828. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.040
- Diaz-Hernandez M, del Puerto A, Diaz-Hernandez JI, Diez-Zaera M, Lucas JJ, Garrido JJ, Miras-Portugal MT (2008) Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *Journal of cell science* 121 (Pt 22):3717-3728. doi:10.1242/jcs.034082
- Diaz-Hernandez M, Diez-Zaera M, Sanchez-Nogueiro J, Gomez-Villafuertes R, Canals JM, Alberch J, Miras-Portugal MT, Lucas JJ (2009) Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (6):1893-1906. doi:10.1096/fj.08-122275
- Dickinson RJ, Keyse SM (2006) Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *Journal of cell science* 119 (Pt 22):4607-4615. doi:10.1242/jcs.03266
- Dickinson RJ, Williams DJ, Slack DN, Williamson J, Seternes OM, Keyse SM (2002) Characterization of a murine gene encoding a developmentally regulated cytoplasmic dual-specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase. *The Biochemical journal* 364 (Pt 1):145-155. doi:10.1042/bj3640145
- Ding Z, Bynagari YS, Mada SR, Jakubowski JA, Kunapuli SP (2009) Studies on the role of the extracellular cysteines and oligomeric structures of the P2Y12 receptor when interacting with antagonists. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 (1):232-234. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03202.x
- Domercq M, Alberdi E, Sanchez-Gomez MV, Ariz U, Perez-Samartin A, Matute C (2011) Dual-specific phosphatase-6 (Dusp6) and ERK mediate AMPA receptor-induced oligodendrocyte death. *The Journal of biological chemistry* 286 (13):11825-11836. doi:10.1074/jbc.M110.153049
- Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF (2007) Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *British journal of pharmacology* 151 (5):571-579. doi:10.1038/sj.bjp.0707265
- Dowd S, Sneddon AA, Keyse SM (1998) Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. *Journal of cell science* 111 ( Pt 22):3389-3399
- Dreixler JC, Bratton A, Du E, Shaikh AR, Savoie B, Alexander M, Marcet MM, Roth S (2011) Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in retinal ischemic preconditioning. *Experimental eye research* 93 (4):340-349. doi:10.1016/j.exer.2010.10.011

- Duric V, Banasr M, Licznarski P, Schmidt HD, Stockmeier CA, Simen AA, Newton SS, Duman RS (2010) A negative regulator of MAP kinase causes depressive behavior. *Nature medicine* 16 (11):1328-1332. doi:10.1038/nm.2219
- Eblaghie MC, Lunn JS, Dickinson RJ, Munsterberg AE, Sanz-Ezquerro JJ, Farrell ER, Mathers J, Keyse SM, Storey K, Tickle C (2003) Negative feedback regulation of FGF signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos. *Current biology : CB* 13 (12):1009-1018
- Ecke D, Hanck T, Tulapurkar ME, Schafer R, Kassack M, Stricker R, Reiser G (2008) Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor. *The Biochemical journal* 409 (1):107-116. doi:10.1042/BJ20070671
- Echevarria D, Martinez S, Marques S, Lucas-Teixeira V, Belo JA (2005) Mkp3 is a negative feedback modulator of Fgf8 signaling in the mammalian isthmic organizer. *Developmental biology* 277 (1):114-128. doi:10.1016/j.ydbio.2004.09.011
- Egan TM, Khakh BS (2004) Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (13):3413-3420. doi:10.1523/JNEUROSCI.5429-03.2004
- Ekerot M, Stavridis MP, Delavaine L, Mitchell MP, Staples C, Owens DM, Keenan ID, Dickinson RJ, Storey KG, Keyse SM (2008) Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *The Biochemical journal* 412 (2):287-298. doi:10.1042/BJ20071512
- Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, Hoertnagl H, Raine CS, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O (2006) The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron* 49 (1):67-79. doi:10.1016/j.neuron.2005.11.027
- Engel T, Gomez-Villafuertes R, Tanaka K, Mesuret G, Sanz-Rodriguez A, Garcia-Huerta P, Miras-Portugal MT, Henshall DC, Diaz-Hernandez M (2012a) Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (4):1616-1628. doi:10.1096/fj.11-196089
- Engel T, Jimenez-Pacheco A, Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M, Henshall DC (2012b) P2X7 receptor in epilepsy; role in pathophysiology and potential targeting for seizure control. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* 4 (4):174-187
- English JM, Pearson G, Baer R, Cobb MH (1998) Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 273 (7):3854-3860. doi:10.1074/jbc.273.7.3854
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA (2006) P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 452 (5):552-562. doi:10.1007/s00424-006-0069-2
- Eric R. Kandel TMJ, James H. Schwartz, Steven A. Siegelbaum, A.J. Hudspeth. (2013) *Principles of Neural Science*. Fifth Edition edn. McGraw Hill Professional,
- Espada S, Ortega F, Molina-Jijon E, Rojo AI, Perez-Sen R, Pedraza-Chaverri J, Miras-Portugal MT, Cuadrado A (2010) The purinergic P2Y(13) receptor activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death. *Free radical biology & medicine* 49 (3):416-426. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.031
- Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Molecular pharmacology* 48 (2):178-183

- Farooq A, Zhou MM (2004) Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cellular signalling* 16 (7):769-779. doi:10.1016/j.cellsig.2003.12.008
- Feng B, Jiao P, Yang Z, Xu H (2012) MEK/ERK pathway mediates insulin-promoted degradation of MKP-3 protein in liver cells. *Molecular and cellular endocrinology* 361 (1-2):116-123. doi:10.1016/j.mce.2012.03.025
- Ferrari D, Strohm C, Schulze-Osthoff K (1999) P2X7/P2Z purinoreceptor-mediated activation of transcription factor NFAT in microglial cells. *The Journal of biological chemistry* 274 (19):13205-13210. doi:10.1074/jbc.274.19.13205
- Flores RV, Hernandez-Perez MG, Aquino E, Garrad RC, Weisman GA, Gonzalez FA (2005) Agonist-induced phosphorylation and desensitization of the P2Y2 nucleotide receptor. *Molecular and cellular biochemistry* 280 (1-2):35-45. doi:10.1007/s11010-005-8050-5
- Franklin CC, Srikanth S, Kraft AS (1998) Conditional expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (6):3014-3019. doi:10.1073/pnas.95.6.3014
- Fredholm BB, Johansson S, Wang YQ (2011) Adenosine and the regulation of metabolism and body temperature. *Advances in pharmacology* 61:77-94. doi:10.1016/B978-0-12-385526-8.00003-5
- Fuller SJ, Stokes L, Skarratt KK, Gu BJ, Wiley JS (2009) Genetics of the P2X7 receptor and human disease. *Purinergic signalling* 5 (2):257-262. doi:10.1007/s11302-009-9136-4
- Gaestel M (2006) MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nature reviews Molecular cell biology* 7 (2):120-130. doi:10.1038/nrm1834
- Gaestel M (2008) Specificity of signaling from MAPKs to MAPKAPs: kinases' tango nuevo. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:6050-6059
- Galban S, Kuwano Y, Pullmann R, Jr., Martindale JL, Kim HH, Lal A, Abdelmohsen K, Yang X, Dang Y, Liu JO, Lewis SM, Holcik M, Gorospe M (2008) RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Molecular and cellular biology* 28 (1):93-107. doi:10.1128/MCB.00973-07
- Gallo V, Suergiu R, Levi G (1987) Functional evaluation of glutamate receptor subtypes in cultured cerebellar neurones and astrocytes. *European journal of pharmacology* 138 (2):293-297. doi:10.1016/0014-2999(87)90448-1
- Ganesh S, Puri R, Singh S, Mittal S, Dubey D (2006) Recent advances in the molecular basis of Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *Journal of human genetics* 51 (1):1-8. doi:10.1007/s10038-005-0321-1
- Gang L, Qun L, Liu WD, Li YS, Xu YZ, Yuan DT (2017) MicroRNA-34a promotes cell cycle arrest and apoptosis and suppresses cell adhesion by targeting DUSP1 in osteosarcoma. *American journal of translational research* 9 (12):5388-5399
- Garcia-Huerta P, Diaz-Hernandez M, Delicado EG, Pimentel-Santillana M, Miras-Portugal MT, Gomez-Villafuertes R (2012) The specificity protein factor Sp1 mediates transcriptional regulation of P2X7 receptors in the nervous system. *The Journal of biological chemistry* 287 (53):44628-44644. doi:10.1074/jbc.M112.390971
- Garcia-Lecea M, Delicado EG, Miras-Portugal MT, Castro E (1999) P2X2 characteristics of the ATP receptor coupled to [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases in cultured Purkinje neurons from neonatal rat cerebellum. *Neuropharmacology* 38 (5):699-706
- Gentry MS, Guinovart JJ, Minassian BA, Roach PJ, Serratosa JM (2018) Lafora disease offers a unique window into neuronal glycogen metabolism. *The Journal of biological chemistry* 293 (19):7117-7125. doi:10.1074/jbc.R117.803064
- Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN (2007) G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26 (22):3122-3142. doi:10.1038/sj.onc.1210407
- Gomez-Villafuertes R, Garcia-Huerta P, Diaz-Hernandez JI, Miras-Portugal MT (2015) PI3K/Akt signaling pathway triggers P2X7 receptor expression as a pro-survival



- factor of neuroblastoma cells under limiting growth conditions. *Scientific reports* 5:18417. doi:10.1038/srep18417
- Gomperts BD (1983) Involvement of guanine nucleotide-binding protein in the gating of  $\text{Ca}^{2+}$  by receptors. *Nature* 306 (5938):64-66. doi:10.1038/306064a0
- Gozdz A, Habas A, Jaworski J, Zielinska M, Albrecht J, Chlystun M, Jalili A, Hetman M (2003) Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the neuroprotective activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 by cisplatin. *The Journal of biological chemistry* 278 (44):43663-43671. doi:10.1074/jbc.M301554200
- Gozdz A, Vashishta A, Kalita K, Szatmari E, Zheng JJ, Tamiya S, Delamere NA, Hetman M (2008) Cisplatin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) by inhibition of ERK1/2 phosphatases. *Journal of neurochemistry* 106 (5):2056-2067. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05550.x
- Habermacher C, Dunning K, Chataigneau T, Grutter T (2016) Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology* 104:18-30. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.07.032
- Hasko G, Pacher P (2008) A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *Journal of leukocyte biology* 83 (3):447-455. doi:10.1189/jlb.0607359
- Hattori M, Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485 (7397):207-212. doi:10.1038/nature11010
- Herculano-Houzel S (2009) The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in human neuroscience* 3:31. doi:10.3389/neuro.09.031.2009
- Hervas C, Perez-Sen R, Miras-Portugal MT (2003) Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *Journal of neuroscience research* 73 (3):384-399. doi:10.1002/jnr.10676
- Hervas C, Perez-Sen R, Miras-Portugal MT (2005) Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochemical pharmacology* 70 (5):770-785. doi:10.1016/j.bcp.2005.05.033
- Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z (1999) Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 274 (32):22569-22580. doi:10.1074/jbc.274.32.22569
- Hibi M, Shimizu T (2012) Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Developmental neurobiology* 72 (3):282-301. doi:10.1002/dneu.20875
- Hickman SE, Semrad CE, Silverstein SC (1996) P2Z purinoceptors. *Ciba Foundation symposium* 198:71-83; discussion 83-90
- Hillmann P, Ko GY, Spinrath A, Raulf A, von Kugelgen I, Wolff SC, Nicholas RA, Kostenis E, Holtje HD, Muller CE (2009) Key determinants of nucleotide-activated G protein-coupled P2Y(2) receptor function revealed by chemical and pharmacological experiments, mutagenesis and homology modeling. *Journal of medicinal chemistry* 52 (9):2762-2775. doi:10.1021/jm801442p
- Hobiger K, Friedrich T (2015) Voltage sensitive phosphatases: emerging kinship to protein tyrosine phosphatases from structure-function research. *Frontiers in pharmacology* 6:20. doi:10.3389/fphar.2015.00020
- Hoffmann C, Moro S, Nicholas RA, Harden TK, Jacobson KA (1999) The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y1 receptor in surface expression and activation processes. *The Journal of biological chemistry* 274 (21):14639-14647. doi:10.1074/jbc.274.21.14639
- Holton P (1959) The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *The Journal of physiology* 145 (3):494-504. doi:10.1113/jphysiol.1959.sp006157
- Horita H, Wada K, Rivas MV, Hara E, Jarvis ED (2010) The dusp1 immediate early gene is regulated by natural stimuli predominantly in sensory input neurons. *The Journal of comparative neurology* 518 (14):2873-2901. doi:10.1002/cne.22370

- Huang CY, Tan TH (2012) DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell & bioscience* 2 (1):24. doi:10.1186/2045-3701-2-24
- Hui LY, Wang YW, Zhou FL, Ma XC, Yan RZ, Zhang L, Wang QL, Yu X (2016) Association Between MKP-1, BDNF, and Gonadal Hormones with Depression on Perimenopausal Women. *Journal of women's health* 25 (1):71-77. doi:10.1089/jwh.2015.5214
- Ingebritsen TS, Cohen P (1983) Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221 (4608):331-338. doi:10.1126/science.6306765
- Irwin JA, Erisir A, Kwon I (2016) Oral Triphenylmethane Food Dye Analog, Brilliant Blue G, Prevents Neuronal Loss in APPSwDI/NOS2-/- Mouse Model. *Current Alzheimer research* 13 (6):663-677
- Ito M (2002) Hopes for cerebellar research in the 21st century. *Cerebellum* 1 (2):93-94
- Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *The Biochemical journal* 353 (Pt 3):417-439. doi:10.1042/0264-6021:3530417
- Jeanneteau F, Chao MV (2013) Are BDNF and glucocorticoid activities calibrated? *Neuroscience* 239:173-195. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.09.017
- Jeanneteau F, Deinhardt K (2011) Fine-tuning MAPK signaling in the brain: The role of MKP-1. *Communicative & integrative biology* 4 (3):281-283. doi:10.4161/cib.4.3.14766
- Jeanneteau F, Deinhardt K, Miyoshi G, Bennett AM, Chao MV (2010) The MAP kinase phosphatase MKP-1 regulates BDNF-induced axon branching. *Nature neuroscience* 13 (11):1373-1379. doi:10.1038/nn.2655
- Jeffrey KL, Brummer T, Rolph MS, Liu SM, Callejas NA, Grumont RJ, Gillieron C, Mackay F, Grey S, Camps M, Rommel C, Gerondakis SD, Mackay CR (2006) Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nature immunology* 7 (3):274-283. doi:10.1038/ni1310
- Jiang LH, Baldwin JM, Roger S, Baldwin SA (2013) Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and Contributions in Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms. *Frontiers in pharmacology* 4:55. doi:10.3389/fphar.2013.00055
- Jiang LH, Rassendren F, Mackenzie A, Zhang YH, Surprenant A, North RA (2005) N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X(7) receptors. *American journal of physiology Cell physiology* 289 (5):C1295-1302. doi:10.1152/ajpcell.00253.2005
- Jiao P, Feng B, Xu H (2012) Mapping MKP-3/FOXO1 interaction and evaluating the effect on gluconeogenesis. *PloS one* 7 (7):e41168. doi:10.1371/journal.pone.0041168
- Jimenez-Pacheco A, Diaz-Hernandez M, Arribas-Blazquez M, Sanz-Rodriguez A, Olivos-Ore LA, Artalejo AR, Alves M, Letavic M, Miras-Portugal MT, Conroy RM, Delanty N, Farrell MA, O'Brien DF, Bhattacharya A, Engel T, Henshall DC (2016) Transient P2X7 Receptor Antagonism Produces Lasting Reductions in Spontaneous Seizures and Gliosis in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36 (22):5920-5932. doi:10.1523/JNEUROSCI.4009-15.2016
- Jimenez-Pacheco A, Mesuret G, Sanz-Rodriguez A, Tanaka K, Mooney C, Conroy R, Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M, Henshall DC, Engel T (2013) Increased neocortical expression of the P2X7 receptor after status epilepticus and anticonvulsant effect of P2X7 receptor antagonist A-438079. *Epilepsia* 54 (9):1551-1561. doi:10.1111/epi.12257
- Jimenez AI, Castro E, Communi D, Boeynaems JM, Delicado EG, Miras-Portugal MT (2000) Coexpression of several types of metabotropic nucleotide receptors in single cerebellar astrocytes. *Journal of neurochemistry* 75 (5):2071-2079. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0752071.x

- Johnson GV, Bailey CD (2003) The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. *Experimental neurology* 183 (2):263-268
- Joseph Altman SAB (1997) Development of the cerebellar system: in relation to its evolution, structure, and functions CRC Press,
- Jurek A, Amagasaki K, Gembarska A, Heldin CH, Lennartsson J (2009) Negative and positive regulation of MAPK phosphatase 3 controls platelet-derived growth factor-induced Erk activation. *The Journal of biological chemistry* 284 (7):4626-4634. doi:10.1074/jbc.M808490200
- Kalkman HO (2012) Potential opposite roles of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in autism spectrum and bipolar disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36 (10):2206-2213. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.07.008
- Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E (1999) Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *The Journal of biological chemistry* 274 (37):26563-26571. doi:10.1074/jbc.274.37.26563
- Kamata H, Oka S, Shibukawa Y, Kakuta J, Hirata H (2005) Redox regulation of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells through modulation of the nerve growth factor receptor, TrkA. *Archives of biochemistry and biophysics* 434 (1):16-25. doi:10.1016/j.abb.2004.07.036
- Kanjhan R, Housley GD, Thorne PR, Christie DL, Palmer DJ, Luo L, Ryan AF (1996) Localization of ATP-gated ion channels in cerebellum using P2x2R subunit-specific antisera. *Neuroreport* 7 (15-17):2665-2669
- Karin M (2006) NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Molecular carcinogenesis* 45 (6):355-361. doi:10.1002/mc.20217
- Karlsson-Rosenthal C, Millar JB (2006) Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends in cell biology* 16 (6):285-292. doi:10.1016/j.tcb.2006.04.002
- Kasler HG, Victoria J, Duramad O, Winoto A (2000) ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Molecular and cellular biology* 20 (22):8382-8389. doi:10.1128/mcb.20.22.8382-8389.2000
- Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD (1997) BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *The EMBO journal* 16 (23):7054-7066. doi:10.1093/emboj/16.23.7054
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460 (7255):592-598. doi:10.1038/nature08198
- Kawate T, Robertson JL, Li M, Silberberg SD, Swartz KJ (2011) Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. *The Journal of general physiology* 137 (6):579-590. doi:10.1085/jgp.201010593
- Keshet Y, Seger R (2010) The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods in molecular biology* 661:3-38. doi:10.1007/978-1-60761-795-2\_1
- Keyse SM (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Current opinion in cell biology* 12 (2):186-192
- Keyse SM, Ginsburg M (1993) Amino acid sequence similarity between CL100, a dual-specificity MAP kinase phosphatase and cdc25. *Trends in biochemical sciences* 18 (10):377-378
- Khadra A, Tomic M, Yan Z, Zemkova H, Sherman A, Stojilkovic SS (2013) Dual gating mechanism and function of P2X7 receptor channels. *Biophysical journal* 104 (12):2612-2621. doi:10.1016/j.bpj.2013.05.006
- Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA (1999) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nature neuroscience* 2 (4):322-330. doi:10.1038/7233
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *The EMBO journal* 20 (22):6347-6358. doi:10.1093/emboj/20.22.6347



- Kim SA, Taylor GS, Torgersen KM, Dixon JE (2002) Myotubularin and MTMR2, phosphatidylinositol 3-phosphatases mutated in myotubular myopathy and type 4B Charcot-Marie-Tooth disease. *The Journal of biological chemistry* 277 (6):4526-4531. doi:10.1074/jbc.M111087200
- Kim SH, Shin SY, Lee KY, Joo EJ, Song JY, Ahn YM, Lee YH, Kim YS (2012) The genetic association of DUSP6 with bipolar disorder and its effect on ERK activity. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 37 (1):41-49. doi:10.1016/j.pnpbp.2011.11.014
- Koga S, Kojima S, Kishimoto T, Kuwabara S, Yamaguchi A (2012) Over-expression of map kinase phosphatase-1 (MKP-1) suppresses neuronal death through regulating JNK signaling in hypoxia/re-oxygenation. *Brain research* 1436:137-146. doi:10.1016/j.brainres.2011.12.004
- Kondoh K, Terasawa K, Morimoto H, Nishida E (2006) Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Molecular and cellular biology* 26 (5):1679-1690. doi:10.1128/MCB.26.5.1679-1690.2006
- Koziol LF, Lutz JT (2013) From movement to thought: the development of executive function. *Applied neuropsychology Child* 2 (2):104-115. doi:10.1080/21622965.2013.748386
- Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews* 81 (2):807-869. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.807
- Lackey EP, Heck DH, Sillitoe RV (2018) Recent advances in understanding the mechanisms of cerebellar granule cell development and function and their contribution to behavior. *F1000Research* 7. doi:10.12688/f1000research.15021.1
- Lammers T, Lavi S (2007) Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 42 (6):437-461. doi:10.1080/10409230701693342
- Lang R, Hammer M, Mages J (2006) DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *Journal of immunology* 177 (11):7497-7504. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7497
- Larsson M, Sawada K, Morland C, Hiasa M, Ormel L, Moriyama Y, Gundersen V (2012) Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cerebral cortex* 22 (5):1203-1214. doi:10.1093/cercor/bhr203
- Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Journal of neurochemistry* 79 (3):463-484. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00607.x
- Lee JD, Rhoades K, Economou JS (1995) Interleukin-4 inhibits the expression of tumour necrosis factors alpha and beta, interleukins-1 beta and -6 and interferon-gamma. *Immunology and cell biology* 73 (1):57-61. doi:10.1038/icb.1995.9
- Leiner HC, Leiner AL, Dow RS (1986) Does the cerebellum contribute to mental skills? *Behavioral neuroscience* 100 (4):443-454
- Leiner HC, Leiner AL, Dow RS (1989) Reappraising the cerebellum: what does the hindbrain contribute to the forebrain? *Behavioral neuroscience* 103 (5):998-1008
- Leiner HC, Leiner AL, Dow RS (1993) Cognitive and language functions of the human cerebellum. *Trends in neurosciences* 16 (11):444-447
- Lenertz LY, Gavala ML, Zhu Y, Bertics PJ (2011) Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X7, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions. *Immunologic research* 50 (1):22-38. doi:10.1007/s12026-011-8203-4
- Levinthal DJ, DeFranco DB (2005) Reversible oxidation of ERK-directed protein phosphatases drives oxidative toxicity in neurons. *The Journal of biological chemistry* 280 (7):5875-5883. doi:10.1074/jbc.M410771200

- Li C, Scott DA, Hatch E, Tian X, Mansour SL (2007) Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development. *Development* 134 (1):167-176. doi:10.1242/dev.02701
- Li J, Gorospe M, Hutter D, Barnes J, Keyse SM, Liu Y (2001) Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation. *Molecular and cellular biology* 21 (23):8213-8224. doi:10.1128/MCB.21.23.8213-8224.2001
- Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J (1996) The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochemical and biophysical research communications* 228 (2):334-340. doi:10.1006/bbrc.1996.1662
- Liao Q, Guo J, Kleeff J, Zimmermann A, Buchler MW, Korc M, Friess H (2003) Down-regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1 suppresses tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 124 (7):1830-1845. doi:10.1016/s0016-5085(03)00398-6
- Liao WH, Cheng CH, Hung KS, Chiu WT, Chen GD, Hwang PP, Hwang SP, Kuan YS, Huang CJ (2013) Protein tyrosine phosphatase receptor type O (Ptpro) regulates cerebellar formation during zebrafish development through modulating Fgf signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70 (13):2367-2381. doi:10.1007/s00018-013-1259-7
- Lin YW, Yang JL (2006) Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling. *The Journal of biological chemistry* 281 (2):915-926. doi:10.1074/jbc.M508720200
- Liu L, Doran S, Xu Y, Manwani B, Ritzel R, Benashski S, McCullough L, Li J (2014) Inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) increases experimental stroke injury. *Experimental neurology* 261:404-411. doi:10.1016/j.expneurol.2014.05.009
- Loda M, Capodiceci P, Mishra R, Yao H, Corless C, Grigioni W, Wang Y, Magi-Galluzzi C, Stork PJ (1996) Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *The American journal of pathology* 149 (5):1553-1564
- Loesch A, Burnstock G (1998) Electron-immunocytochemical localization of P2X1 receptors in the rat cerebellum. *Cell and tissue research* 294 (2):253-260
- Lom B, Cohen-Cory S (1999) Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates retinal ganglion cell dendritic and axonal arborization in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 (22):9928-9938
- Lucae S, Salyakina D, Barden N, Harvey M, Gagne B, Labbe M, Binder EB, Uhr M, Paez-Pereda M, Sillaber I, Ising M, Bruckl T, Lieb R, Holsboer F, Muller-Myhsok B (2006) P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Human molecular genetics* 15 (16):2438-2445. doi:10.1093/hmg/ddl166
- Luo Y, DeFranco DB (2006) Opposing roles for ERK1/2 in neuronal oxidative toxicity: distinct mechanisms of ERK1/2 action at early versus late phases of oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 281 (24):16436-16442. doi:10.1074/jbc.M512430200
- Luthi-Carter R (2003) Progress towards a vaccine for Huntington's disease. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 7 (5 Pt 1):569-570. doi:10.1016/s1525-0016(03)00107-2
- Maillet M, Purcell NH, Sargent MA, York AJ, Bueno OF, Molkentin JD (2008) DUSP6 (MKP3) null mice show enhanced ERK1/2 phosphorylation at baseline and increased myocyte proliferation in the heart affecting disease susceptibility. *The Journal of biological chemistry* 283 (45):31246-31255. doi:10.1074/jbc.M806085200
- Maraula G, Lana D, Coppi E, Gentile F, Mello T, Melani A, Galli A, Giovannini MG, Pedata F, Pugliese AM (2014) The selective antagonism of P2X7 and P2Y1

- receptors prevents synaptic failure and affects cell proliferation induced by oxygen and glucose deprivation in rat dentate gyrus. *PloS one* 9 (12):e115273. doi:10.1371/journal.pone.0115273
- Marcillo A, Frydel B, Bramlett HM, Dietrich WD (2012) A reassessment of P2X7 receptor inhibition as a neuroprotective strategy in rat models of contusion injury. *Experimental neurology* 233 (2):687-692. doi:10.1016/j.expneurol.2011.06.008
- Marchetti S, Gimond C, Chambard JC, Touboul T, Roux D, Pouyssegur J, Pages G (2005) Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Molecular and cellular biology* 25 (2):854-864. doi:10.1128/MCB.25.2.854-864.2005
- Marien P, Beaton A (2014) The enigmatic linguistic cerebellum: clinical relevance and unanswered questions on nonmotor speech and language deficits in cerebellar disorders. *Cerebellum & ataxias* 1:12. doi:10.1186/2053-8871-1-12
- Mateo J, Garcia-Lecea M, Miras-Portugal MT, Castro E (1998) Ca<sup>2+</sup> signals mediated by P2X-type purinoceptors in cultured cerebellar Purkinje cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (5):1704-1712
- McAllister AK (2001) Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58 (8):1054-1060. doi:10.1007/PL00000920
- Meek J, Yang JY, Han VZ, Bell CC (2008) Morphological analysis of the mormyrid cerebellum using immunohistochemistry, with emphasis on the unusual neuronal organization of the valvula. *The Journal of comparative neurology* 510 (4):396-421. doi:10.1002/cne.21809
- Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15 (4):805-819
- Miras-Portugal MT, Sebastian-Serrano A, de Diego Garcia L, Diaz-Hernandez M (2017) Neuronal P2X7 Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37 (30):7063-7072. doi:10.1523/JNEUROSCI.3104-16.2017
- Missinato MA, Saydmohammed M, Zuppo DA, Rao KS, Opie GW, Kuhn B, Tsang M (2018) Dusp6 attenuates Ras/MAPK signaling to limit zebrafish heart regeneration. *Development* 145 (5). doi:10.1242/dev.157206
- Miyaji T, Sawada K, Omote H, Moriyama Y (2011) Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. *The Journal of biological chemistry* 286 (50):42881-42887. doi:10.1074/jbc.M111.277269
- Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K (1997) A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *The Journal of biological chemistry* 272 (26):16657-16662. doi:10.1074/jbc.272.26.16657
- Molina G, Vogt A, Bakan A, Dai W, Queiroz de Oliveira P, Znosko W, Smithgall TE, Bahar I, Lazo JS, Day BW, Tsang M (2009) Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages. *Nature chemical biology* 5 (9):680-687. doi:10.1038/nchembio.190
- Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemee A (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nature reviews Molecular cell biology* 8 (3):234-244. doi:10.1038/nrm2126
- Morelli M, Carta AR, Kachroo A, Schwarzschild MA (2010) Pathophysiological roles for purines: adenosine, caffeine and urate. *Progress in brain research* 183:183-208. doi:10.1016/S0079-6123(10)83010-9
- Moreno-Rius J (2018) The cerebellum in fear and anxiety-related disorders. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 85:23-32. doi:10.1016/j.pnpbp.2018.04.002

- Morente Rodríguez V (2013) Regulación de las proteínas fosfatasa de especificidad dual (DUSP2 y DUSP6) por receptores de nucleótidos en neuronas granulares (Tesis Doctoral) Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Morente V, Perez-Sen R, Ortega F, Huerta-Cepas J, Delicado EG, Miras-Portugal MT (2014) Neuroprotection elicited by P2Y<sub>13</sub> receptors against genotoxic stress by inducing DUSP2 expression and MAPK signaling recovery. *Biochimica et biophysica acta* 1843 (9):1886-1898. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.004
- Muda M, Boschert U, Dickinson R, Martinou JC, Martinou I, Camps M, Schlegel W, Arkinstall S (1996) MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 271 (8):4319-4326. doi:10.1074/jbc.271.8.4319
- Munro S, Cuthbertson DJ, Cunningham J, Sales M, Cohen PT (2002) Human skeletal muscle expresses a glycogen-targeting subunit of PP1 that is identical to the insulin-sensitive glycogen-targeting subunit G(L) of liver. *Diabetes* 51 (3):591-598. doi:10.2337/diabetes.51.3.591
- Mustelin T (2006) Protein tyrosine phosphatases in human disease. *Advances in experimental medicine and biology* 584:53-72. doi:10.1007/0-387-34132-3\_5
- Navarro G, Borroto-Escuela DO, Fuxe K, Franco R (2016) Purinergic signaling in Parkinson's disease. Relevance for treatment. *Neuropharmacology* 104:161-168. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.07.024
- Ndong C, Landry RP, DeLeo JA, Romero-Sandoval EA (2012) Mitogen activated protein kinase phosphatase-1 prevents the development of tactile sensitivity in a rodent model of neuropathic pain. *Molecular pain* 8:34. doi:10.1186/1744-8069-8-34
- Nicke A, Kuan YH, Masin M, Rettinger J, Marquez-Klaka B, Bender O, Gorecki DC, Murrell-Lagnado RD, Soto F (2009) A functional P2X<sub>7</sub> splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X<sub>7</sub> knock-out mice. *The Journal of biological chemistry* 284 (38):25813-25822. doi:10.1074/jbc.M109.033134
- Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, Mizuno K, Uemura T (2002) Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 108 (2):233-246. doi:10.1016/s0092-8674(01)00638-9
- Nopoulos PC, Ceilley JW, Gailis EA, Andreasen NC (1999) An MRI study of cerebellar vermis morphology in patients with schizophrenia: evidence in support of the cognitive dysmetria concept. *Biological psychiatry* 46 (5):703-711
- North RA (1996) P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels. *Ciba Foundation symposium* 198:91-105; discussion 105-109
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* 82 (4):1013-1067. doi:10.1152/physrev.00015.2002
- Obersteiner H (1880) Beitrage zur Kenntniss von feineren Bau der Kleinhirnrinde. *Sitzungsb Kais Akad Wissench* 60:101-114
- Ohta Y, Kousaka K, Nagata-Ohashi K, Ohashi K, Muramoto A, Shima Y, Niwa R, Uemura T, Mizuno K (2003) Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 8 (10):811-824
- Ortega F, Perez-Sen R, Delicado EG, Miras-Portugal MT (2009) P2X<sub>7</sub> nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons. *Neurotoxicity research* 15 (3):193-204. doi:10.1007/s12640-009-9020-6
- Ortega F, Perez-Sen R, Delicado EG, Teresa Miras-Portugal M (2011) ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y<sub>13</sub> and P2X<sub>7</sub> receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology* 61 (8):1210-1221. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.07.010
- Ortega F, Perez-Sen R, Miras-Portugal MT (2008) Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in



- granule neurons. *Journal of neurochemistry* 104 (1):62-73. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05021.x
- Ortega F, Perez-Sen R, Morente V, Delicado EG, Miras-Portugal MT (2010) P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 67 (10):1723-1733. doi:10.1007/s00018-010-0278-x
- Paes-De-Carvalho R (2002) Adenosine as a signaling molecule in the retina: biochemical and developmental aspects. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 74 (3):437-451
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 452 (5):589-597. doi:10.1007/s00424-006-0061-x
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA (2007) Quantal release of ATP in mouse cortex. *The Journal of general physiology* 129 (3):257-265. doi:10.1085/jgp.200609693
- Partanen J (2007) FGF signalling pathways in development of the midbrain and anterior hindbrain. *Journal of neurochemistry* 101 (5):1185-1193. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04463.x
- Pastor-Anglada M, Perez-Torras S (2015) Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Frontiers in pharmacology* 6:13. doi:10.3389/fphar.2015.00013
- Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ (2009) Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *The Biochemical journal* 418 (3):475-489. doi:10.1042/bj20082234
- Peng HQ, Liu L, Goss PE, Bailey D, Hogg D (1999) Chromosomal deletions occur in restricted regions of 5q in testicular germ cell cancer. *Oncogene* 18 (21):3277-3283. doi:10.1038/sj.onc.1202662
- Perander M, Keyse SM, Seternes OM (2008) Does MK5 reconcile classical and atypical MAP kinases? *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:4617-4624
- Peti W, Page R (2013) Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein science : a publication of the Protein Society* 22 (12):1698-1710. doi:10.1002/pro.2374
- Pons S, Trejo JL, Martinez-Morales JR, Marti E (2001) Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development* 128 (9):1481-1492
- Queipo MJ, Gil-Redondo JC, Morente V, Ortega F, Miras-Portugal MT, Delicado EG, Perez-Sen R (2017) P2X7 Nucleotide and EGF Receptors Exert Dual Modulation of the Dual-Specificity Phosphatase 6 (MKP-3) in Granule Neurons and Astrocytes, Contributing to Negative Feedback on ERK Signaling. *Frontiers in molecular neuroscience* 10:448. doi:10.3389/fnmol.2017.00448
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *The Journal of biological chemistry* 270 (13):7420-7426. doi:10.1074/jbc.270.13.7420
- Raman M, Chen W, Cobb MH (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26 (22):3100-3112. doi:10.1038/sj.onc.1210392
- Ramon y Cajal S (1911) *Histology du system nerveux de l'homme et vertebres*. Paris: Maloine A 2:25-17
- Ramos JW (2008) The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40 (12):2707-2719. doi:10.1016/j.biocel.2008.04.009
- Rane SG (1999) Ion channels as physiological effectors for growth factor receptor and Ras/ERK signaling pathways. *Advances in second messenger and phosphoprotein research* 33:107-127
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA.

- The Journal of biological chemistry 272 (9):5482-5486. doi:10.1074/jbc.272.9.5482
- Rebola N, Oliveira CR, Cunha RA (2002) Transducing system operated by adenosine A(2A) receptors to facilitate acetylcholine release in the rat hippocampus. *European journal of pharmacology* 454 (1):31-38. doi:10.1016/s0014-2999(02)02475-5
- Reffas S, Schlegel W (2000) Compartment-specific regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by ERK-dependent and non-ERK-dependent inductions of MAPK phosphatase (MKP)-3 and MKP-1 in differentiating P19 cells. *The Biochemical journal* 352 Pt 3:701-708
- Rhoton AL, Jr. (2000) Cerebellum and fourth ventricle. *Neurosurgery* 47 (3 Suppl):S7-27. doi:10.1097/00006123-200009001-00007
- Rios P, Nunes-Xavier CE, Tabernero L, Kohn M, Pulido R (2014) Dual-specificity phosphatases as molecular targets for inhibition in human disease. *Antioxidants & redox signaling* 20 (14):2251-2273. doi:10.1089/ars.2013.5709
- Ronkina N, Kotlyarov A, Gaestel M (2008) MK2 and MK3--a pair of isoenzymes? *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:5511-5521
- Roostaei T, Nazeri A, Sahraian MA, Minagar A (2014) The human cerebellum: a review of physiologic neuroanatomy. *Neurologic clinics* 32 (4):859-869. doi:10.1016/j.ncl.2014.07.013
- Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 68 (2):320-344. doi:10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004
- Rudolph R, Jahn HM, Courjaret R, Messemer N, Kirchhoff F, Deitmer JW (2016) The inhibitory input to mouse cerebellar Purkinje cells is reciprocally modulated by Bergmann glial P2Y1 and AMPA receptor signaling. *Glia* 64 (7):1265-1280. doi:10.1002/glia.22999
- Rusnak F, Mertz P (2000) Calcineurin: form and function. *Physiological reviews* 80 (4):1483-1521. doi:10.1152/physrev.2000.80.4.1483
- Russell P, Nurse P (1986) cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45 (1):145-153. doi:10.1016/0092-8674(86)90546-5
- Ryser S, Massiha A, Piuz I, Schlegel W (2004) Stimulated initiation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) gene transcription involves the synergistic action of multiple cis-acting elements in the proximal promoter. *The Biochemical journal* 378 (Pt 2):473-484. doi:10.1042/BJ20031022
- Salojin KV, Owusu IB, Millerchip KA, Potter M, Platt KA, Oravec T (2006) Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses. *Journal of immunology* 176 (3):1899-1907. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1899
- Samways DS, Khakh BS, Dutertre S, Egan TM (2011) Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (33):13800-13805. doi:10.1073/pnas.1017550108
- Sanchez-Perez I, Martinez-Gomariz M, Williams D, Keyse SM, Perona R (2000) CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* 19 (45):5142-5152. doi:10.1038/sj.onc.1203887
- Sato M, Vaughan MB, Girard L, Peyton M, Lee W, Shames DS, Ramirez RD, Sunaga N, Gazdar AF, Shay JW, Minna JD (2006) Multiple oncogenic changes (K-RAS(V12), p53 knockdown, mutant EGFRs, p16 bypass, telomerase) are not sufficient to confer a full malignant phenotype on human bronchial epithelial cells. *Cancer research* 66 (4):2116-2128. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2521
- Savi P, Zacharyus JL, Delesque-Touchard N, Labouret C, Herve C, Uzabiaga MF, Pereillo JM, Culouscou JM, Bono F, Ferrara P, Herbert JM (2006) The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them

- out of lipid rafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (29):11069-11074. doi:10.1073/pnas.0510446103
- Schmahmann JD (1991) An emerging concept. The cerebellar contribution to higher function. *Archives of neurology* 48 (11):1178-1187
- Schmahmann JD (2019) The cerebellum and cognition. *Neuroscience letters* 688:62-75. doi:10.1016/j.neulet.2018.07.005
- Schmoll M, Dattenbock C, Carreras-Villasenor N, Mendoza-Mendoza A, Tisch D, Aleman MI, Baker SE, Brown C, Cervantes-Badillo MG, Cetz-Chel J, Cristobal-Mondragon GR, Delaye L, Esquivel-Naranjo EU, Frischmann A, Gallardo-Negrete Jde J, Garcia-Esquivel M, Gomez-Rodriguez EY, Greenwood DR, Hernandez-Onate M, Kruszkowska JS, Lawry R, Mora-Montes HM, Munoz-Centeno T, Nieto-Jacobo MF, Nogueira Lopez G, Olmedo-Monfil V, Osorio-Concepcion M, Pilsyk S, Pomraning KR, Rodriguez-Iglesias A, Rosales-Saavedra MT, Sanchez-Arreguin JA, Seidl-Seiboth V, Stewart A, Uresti-Rivera EE, Wang CL, Wang TF, Zeilinger S, Casas-Flores S, Herrera-Estrella A (2016) The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 80 (1):205-327. doi:10.1128/MMBR.00040-15
- Schwarz N, Drouot L, Nicke A, Fliegert R, Boyer O, Guse AH, Haag F, Adriouch S, Koch-Nolte F (2012) Alternative splicing of the N-terminal cytosolic and transmembrane domains of P2X7 controls gating of the ion channel by ADP-ribosylation. *PloS one* 7 (7):e41269. doi:10.1371/journal.pone.0041269
- Sebastian-Serrano A, Engel T, de Diego-Garcia L, Olivos-Ore LA, Arribas-Blazquez M, Martinez-Frailes C, Perez-Diaz C, Millan JL, Artalejo AR, Miras-Portugal MT, Henshall DC, Diaz-Hernandez M (2016) Neurodevelopmental alterations and seizures developed by mouse model of infantile hypophosphatasia are associated with purinergic signalling deregulation. *Human molecular genetics* 25 (19):4143-4156. doi:10.1093/hmg/ddw248
- Sebastiao AM, Ribeiro JA (2000) Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends in pharmacological sciences* 21 (9):341-346
- Segal RA, Pomeroy SL, Stiles CD (1995) Axonal growth and fasciculation linked to differential expression of BDNF and NT3 receptors in developing cerebellar granule cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15 (7 Pt 1):4970-4981
- Shenoy SK (2011) Visualizing G protein-coupled receptor signalsomes using confocal immunofluorescence microscopy. *Methods in molecular biology* 756:333-342. doi:10.1007/978-1-61779-160-4\_20
- Shi Y (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 139 (3):468-484. doi:10.1016/j.cell.2009.10.006
- Shin JW, Kwon SB, Bak Y, Lee SK, Yoon DY (2018) BCI induces apoptosis via generation of reactive oxygen species and activation of intrinsic mitochondrial pathway in H1299 lung cancer cells. *Science China Life sciences* 61 (10):1243-1253. doi:10.1007/s11427-017-9191-1
- Shipp LE, Lee JV, Yu CY, Pufall M, Zhang P, Scott DK, Wang JC (2010) Transcriptional regulation of human dual specificity protein phosphatase 1 (DUSP1) gene by glucocorticoids. *PloS one* 5 (10):e13754. doi:10.1371/journal.pone.0013754
- Sild M, Ruthazer ES (2011) Radial glia: progenitor, pathway, and partner. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 17 (3):288-302. doi:10.1177/1073858410385870
- Singh GB, Raut SK, Khanna S, Kumar A, Sharma S, Prasad R, Khullar M (2017) MicroRNA-200c modulates DUSP-1 expression in diabetes-induced cardiac hypertrophy. *Molecular and cellular biochemistry* 424 (1-2):1-11. doi:10.1007/s11010-016-2838-3
- Smith TG, Karlsson M, Lunn JS, Eblaghie MC, Keenan ID, Farrell ER, Tickle C, Storey KG, Keyse SM (2006) Negative feedback predominates over cross-regulation to



- control ERK MAPK activity in response to FGF signalling in embryos. *FEBS letters* 580 (17):4242-4245. doi:10.1016/j.febslet.2006.06.081
- Sokolov AA, Miall RC, Ivry RB (2017) The Cerebellum: Adaptive Prediction for Movement and Cognition. *Trends in cognitive sciences* 21 (5):313-332. doi:10.1016/j.tics.2017.02.005
- Sorge RE, Trang T, Dorfman R, Smith SB, Beggs S, Ritchie J, Austin JS, Zaykin DV, Vander Meulen H, Costigan M, Herbert TA, Yarkoni-Abitbul M, Tichauer D, Livneh J, Gershon E, Zheng M, Tan K, John SL, Slade GD, Jordan J, Woolf CJ, Peltz G, Maixner W, Diatchenko L, Seltzer Z, Salter MW, Mogil JS (2012) Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nature medicine* 18 (4):595-599. doi:10.1038/nm.2710
- Sperlagh B, Illes P (2014) P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends in pharmacological sciences* 35 (10):537-547. doi:10.1016/j.tips.2014.08.002
- Sperlagh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P (2006) P2X7 receptors in the nervous system. *Progress in neurobiology* 78 (6):327-346. doi:10.1016/j.pneurobio.2006.03.007
- Srikanth S, Franklin CC, Duke RC, Kraft RS (1999) Human DU145 prostate cancer cells overexpressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 are resistant to Fas ligand-induced mitochondrial perturbations and cellular apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry* 199 (1-2):169-178
- Stanciu M, Wang Y, Kentor R, Burke N, Watkins S, Kress G, Reynolds I, Klann E, Angiolieri MR, Johnson JW, DeFranco DB (2000) Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *The Journal of biological chemistry* 275 (16):12200-12206. doi:10.1074/jbc.275.16.12200
- Staples CJ, Owens DM, Maier JV, Cato AC, Keyse SM (2010) Cross-talk between the p38alpha and JNK MAPK pathways mediated by MAP kinase phosphatase-1 determines cellular sensitivity to UV radiation. *The Journal of biological chemistry* 285 (34):25928-25940. doi:10.1074/jbc.M110.117911
- Stewart AE, Dowd S, Keyse SM, McDonald NQ (1999) Crystal structure of the MAPK phosphatase Pyst1 catalytic domain and implications for regulated activation. *Nature structural biology* 6 (2):174-181. doi:10.1038/5861
- Sun C, Heid ME, Keyel PA, Salter RD (2013) The second transmembrane domain of P2X7 contributes to dilated pore formation. *PloS one* 8 (4):e61886. doi:10.1371/journal.pone.0061886
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272 (5262):735-738. doi:10.1126/science.272.5262.735
- Suzaki Y, Yoshizumi M, Kagami S, Koyama AH, Taketani Y, Houchi H, Tsuchiya K, Takeda E, Tamaki T (2002) Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults. *The Journal of biological chemistry* 277 (11):9614-9621. doi:10.1074/jbc.M111790200
- Suzuki T, Namba K, Tsuga H, Nakata H (2006) Regulation of pharmacology by hetero-oligomerization between A1 adenosine receptor and P2Y2 receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 351 (2):559-565. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.075
- Tanoue T, Yamamoto T, Maeda R, Nishida E (2001) A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *The Journal of biological chemistry* 276 (28):26629-26639. doi:10.1074/jbc.M101981200
- Tanoue T, Yamamoto T, Nishida E (2002) Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases. *The Journal of biological chemistry* 277 (25):22942-22949. doi:10.1074/jbc.M202096200

- Tatham PE, Lindau M (1990) ATP-induced pore formation in the plasma membrane of rat peritoneal mast cells. *The Journal of general physiology* 95 (3):459-476. doi:10.1085/jgp.95.3.459
- Theodosiou A, Ashworth A (2002) MAP kinase phosphatases. *Genome biology* 3 (7):REVIEWS3009. doi:10.1186/gb-2002-3-7-reviews3009
- Thi MM, Islam S, Suadicani SO, Spray DC (2012) Connexin43 and pannexin1 channels in osteoblasts: who is the "hemichannel"? *The Journal of membrane biology* 245 (7):401-409. doi:10.1007/s00232-012-9462-2
- Tonazzini I, Trincavelli ML, Montali M, Martini C (2008) Regulation of A1 adenosine receptor functioning induced by P2Y1 purinergic receptor activation in human astroglial cells. *Journal of neuroscience research* 86 (13):2857-2866. doi:10.1002/jnr.21727
- Tonks NK (2005) Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell* 121 (5):667-670. doi:10.1016/j.cell.2005.05.016
- Tsao HK, Chiu PH, Sun SH (2013) PKC-dependent ERK phosphorylation is essential for P2X7 receptor-mediated neuronal differentiation of neural progenitor cells. *Cell death & disease* 4:e751. doi:10.1038/cddis.2013.274
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36 (9):1285-1294
- Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A (1999) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nature neuroscience* 2 (4):315-321. doi:10.1038/7225
- Visintin R, Craig K, Hwang ES, Prinz S, Tyers M, Amon A (1998) The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Molecular cell* 2 (6):709-718
- Vulchanova L, Arvidsson U, Riedl M, Wang J, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R (1996) Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (15):8063-8067. doi:10.1073/pnas.93.15.8063
- Waetzig V, Herdegen T (2003) The concerted signaling of ERK1/2 and JNKs is essential for PC12 cell neuritogenesis and converges at the level of target proteins. *Molecular and cellular neurosciences* 24 (1):238-249
- Wagner EF, Nebreda AR (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature reviews Cancer* 9 (8):537-549. doi:10.1038/nrc2694
- Waha A, Felsberg J, Hartmann W, von dem Knesebeck A, Mikeska T, Joos S, Wolter M, Koch A, Yan PS, Endl E, Wiestler OD, Reifenberger G, Pietsch T, Waha A (2010) Epigenetic downregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-2 relieves its growth suppressive activity in glioma cells. *Cancer research* 70 (4):1689-1699. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3218
- Walhout RJ, Lekkerkerker JC, Oron GH, Hitchcock FJ, Meijboom EJ, Bennink GB (2003) Comparison of polytetrafluoroethylene patch aortoplasty and end-to-end anastomosis for coarctation of the aorta. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 126 (2):521-528
- Wang CH, Zhang XL, Li Y, Wang GD, Wang XK, Dong J, Ning QF (2015) Role of hippocampus mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 mRNA expression and DNA methylation in the depression of the rats with chronic unpredicted stress. *Cellular and molecular neurobiology* 35 (4):473-482. doi:10.1007/s10571-014-0141-y
- Wang J, Ford HR, Grishin AV (2010) NF-kappaB-mediated expression of MAPK phosphatase-1 is an early step in desensitization to TLR ligands in enterocytes. *Mucosal immunology* 3 (5):523-534. doi:10.1038/mi.2010.35
- Wang LN, Wang C, Lin Y, Xi YH, Zhang WH, Zhao YJ, Li HZ, Tian Y, Lv YJ, Yang BF, Xu CQ (2008) Involvement of calcium-sensing receptor in cardiac hypertrophy-

- induced by angiotensinII through calcineurin pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 369 (2):584-589. doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.053
- Wang SS, Kloth AD, Badura A (2014) The cerebellum, sensitive periods, and autism. *Neuron* 83 (3):518-532. doi:10.1016/j.neuron.2014.07.016
- Wang XH, Xie X, Luo XG, Shang H, He ZY (2017) Inhibiting purinergic P2X7 receptors with the antagonist brilliant blue G is neuroprotective in an intranigral lipopolysaccharide animal model of Parkinson's disease. *Molecular medicine reports* 15 (2):768-776. doi:10.3892/mmr.2016.6070
- Wang Z, Xu J, Zhou JY, Liu Y, Wu GS (2006) Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance. *Cancer research* 66 (17):8870-8877. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1280
- Wassink TH, Andreasen NC, Nopoulos P, Flaum M (1999) Cerebellar morphology as a predictor of symptom and psychosocial outcome in schizophrenia. *Biological psychiatry* 45 (1):41-48
- Weisman GA, Camden JM, Peterson TS, Ajit D, Woods LT, Erb L (2012) P2 receptors for extracellular nucleotides in the central nervous system: role of P2X7 and P2Y(2) receptor interactions in neuroinflammation. *Molecular neurobiology* 46 (1):96-113. doi:10.1007/s12035-012-8263-z
- White JJ, Sillitoe RV (2013) Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* 2 (1):149-164. doi:10.1002/wdev.65
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews* 79 (1):143-180. doi:10.1152/physrev.1999.79.1.143
- Wiley JS, Sluyter R, Gu BJ, Stokes L, Fuller SJ (2011) The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue antigens* 78 (5):321-332. doi:10.1111/j.1399-0039.2011.01780.x
- Wilson HL, Wilson SA, Surprenant A, North RA (2002) Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus. *The Journal of biological chemistry* 277 (37):34017-34023. doi:10.1074/jbc.M205120200
- Wishart MJ, Dixon JE (2002) PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. *Trends in cell biology* 12 (12):579-585
- Wu G, Tan J, Li J, Sun X, Du L, Tao S (2019) miRNA-145-5p induces apoptosis after ischemia-reperfusion by targeting dual specificity phosphatase 6. *Journal of cellular physiology*. doi:10.1002/jcp.28291
- Xu H, Yang Y, Tang X, Zhao M, Liang F, Xu P, Hou B, Xing Y, Bao X, Fan X (2013) Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. *Molecular neurobiology* 47 (2):833-844. doi:10.1007/s12035-013-8405-y
- Xu Q, Konta T, Nakayama K, Furusu A, Moreno-Manzano V, Lucio-Cazana J, Ishikawa Y, Fine LG, Yao J, Kitamura M (2004) Cellular defense against H2O2-induced apoptosis via MAP kinase-MKP-1 pathway. *Free radical biology & medicine* 36 (8):985-993. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.009
- Xu S, Furukawa T, Kanai N, Sunamura M, Horii A (2005) Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. *Journal of human genetics* 50 (4):159-167. doi:10.1007/s10038-005-0235-y
- Yang CC, Ornatsky OI, McDermott JC, Cruz TF, Prody CA (1998) Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic acids research* 26 (20):4771-4777. doi:10.1093/nar/26.20.4771
- Yang J, Lu YW, Lu MM, Leng RX, Pan HF, Ye DQ (2013) MicroRNA-101, mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinases phosphatase-1 in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 22 (2):115-120. doi:10.1177/0961203312465779

- Yoshioka K, Hosoda R, Kuroda Y, Nakata H (2002) Hetero-oligomerization of adenosine A1 receptors with P2Y1 receptors in rat brains. *FEBS letters* 531 (2):299-303. doi:10.1016/s0014-5793(02)03540-8
- Zanovello P, Bronte V, Rosato A, Pizzo P, Di Virgilio F (1990) Responses of mouse lymphocytes to extracellular ATP. II. Extracellular ATP causes cell type-dependent lysis and DNA fragmentation. *Journal of immunology* 145 (5):1545-1550
- Zehorai E, Yao Z, Plotnikov A, Seger R (2010) The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Molecular and cellular endocrinology* 314 (2):213-220. doi:10.1016/j.mce.2009.04.008
- Zhang J, Zhang K, Gao ZG, Paoletta S, Zhang D, Han GW, Li T, Ma L, Zhang W, Muller CE, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Katritch V, Jacobson KA, Stevens RC, Wu B, Zhao Q (2014) Agonist-bound structure of the human P2Y12 receptor. *Nature* 509 (7498):119-122. doi:10.1038/nature13288
- Zhao Q, Wang X, Nelin LD, Yao Y, Matta R, Manson ME, Baliga RS, Meng X, Smith CV, Bauer JA, Chang CH, Liu Y (2006) MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *The Journal of experimental medicine* 203 (1):131-140. doi:10.1084/jem.20051794
- Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362 (4-5):299-309
- Zimmermann H (2001) Ecto-nucleotidases. In: Abbracchio MP WM (ed) *Handbook of experimental pharmacology. Purinergic and pyrimidergic signalling.* . Springer, Berlin Heidelberg New York, pp pp 209–250